

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Nutrición y Bromatología III  
(Higiene y Tecnología de los Alimentos)**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE ENTEROCINAS  
PRODUCIDAS POR CEPAS DE “ENTEROCOCCUS FAECIUM” DE  
ORIGEN CÁRNICO: OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN  
MOLECULAR DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P DE  
“ENTEROCOCCUS FAECIUM” P13**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Carmen Herranz Sorribes**

Bajo la dirección de los doctores

Luis Cintas Izarra  
Juan Miguel Rodríguez Gómez  
Pablo Elpidio Hernández Cruza

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2150-8**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III**

**(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE  
ENTEROCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE  
*Enterococcus faecium* DE ORIGEN CÁRNICO.  
OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y MECANISMO  
MOLECULAR DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P DE  
*Enterococcus faecium* P13**

**Carmen Herranz Sorribes**

**Madrid, 2000**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III  
(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE  
ENTEROCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE  
*Enterococcus faecium* DE ORIGEN CÁRNICO.  
OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y MECANISMO  
MOLECULAR DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P DE  
*Enterococcus faecium* P13**

Memoria que, para optar al título de Doctor, con mención honorífica de  
“Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada Carmen Herranz Sorribes

Madrid, octubre de 2000

LUIS M. CINTAS IZARRA, JUAN M. RODRÍGUEZ GÓMEZ Y PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, AYUDANTE DE FACULTAD, PROFESOR TITULAR Y CATEDRÁTICO, RESPECTIVAMENTE, DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización bioquímica y genética parcial de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico. Optimización de la producción y mecanismo molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. Carmen Herranz Sorribes, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 15 de octubre de 2000.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Luis M. Cintas Izarra

Juan M. Rodríguez Gómez

Pablo E. Hernández Cruza

**A mis padres**

**A Juanjo, Begoña y Rubén**

**A mis abuelos**

**A Paolo**

Entonces apareció el zorro.

-Buenos días- dijo el zorro.

-Buenos días- respondió cortésmente el principito, que se volvió, pero no vio nada.

-Estoy aquí- dijo la voz- bajo el manzano...

-¿Quién eres?- dijo el principito-. Eres muy lindo...

-Soy un zorro- dijo el zorro.

-Juega conmigo- le propuso el principito-. Estoy tan triste...

-No puedo jugar contigo- dijo el zorro-. No estoy domesticado.

-¡Ah! Perdón- dijo el principito.

Pero después de reflexionar, agregó:

-¿Qué significa "domesticar"?

-Tú no eres de aquí- dijo el zorro-. ¿Qué buscas?

-Busco a los hombres-dijo el principito-. ¿Qué significa "domesticar"?

-Los hombres- dijo el zorro- tienen fusiles y cazan. Es muy molesto. También crían gallinas. Es su único interés.

¿Buscas gallinas?

-No- dijo el principito-. Busco amigos. ¿Qué significa "domesticar"?

-Es algo demasiado olvidado- dijo el zorro-. Significa "crear lazos".

-¿Crear lazos?

-Sí- dijo el zorro-. Para mí no eres aún más que un muchachito semejante a cien mil muchachitos. Y no tengo necesidad de ti. Y tú tampoco me necesitas. No soy para ti más que un zorro semejante a cien mil zorros. Pero si me domesticas, tendremos necesidad uno del otro. Para mí serás único en el mundo. Y seré para ti único en el mundo...

-Comienzo a comprender- dijo el principito-. Hay una flor...,creo que me ha domesticado.

-Es posible- dijo el zorro-. En la Tierra se ve de todo...

-¡Oh! No es en la Tierra- dijo el principito

El zorro pareció muy intrigado:

-¿En otro planeta?

-Sí

-¿Hay cazadores en ese planeta?

-No.

-¡Es interesante eso! ¿Hay gallinas?

-No.

-Nada es perfecto- suspiró el zorro.

(A. de Saint-Exupéry)

Dedicado a Ana M. Suárez, Maribel Martínez y Jose M. Martínez, mis predecesores

Me gustaría expresar mi gratitud a todas las personas que, de alguna manera, han participado en la realización de esta Tesis Doctoral.

A Juan A. Ordóñez Pereda, director del Departamento de Nutrición y Bromatología III durante el período de realización del presente trabajo, por aceptarme en el Departamento y por su colaboración a lo largo de estos años.

A Pablo E. Hernández Cruza por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación. Pablo, gracias por tu tiempo y constante disponibilidad, por tu esfuerzo para que el trabajo siguiera siempre hacia delante y por confiar en mí en todo momento.

A Juan M. Rodríguez Gómez, por todo lo que me ha enseñado, por su ayuda incondicional, por sus contribuciones artísticas en este trabajo. Además, gracias Juan por tu buen humor, por tu (sana) ironía, y por transmitirme parte de tus conocimientos sobre la geografía soriana, el erotismo en el arte románico y el hombre de Atapuerca. ¡Qué se prepare el Alto Aragón!

A Luis M. Cintas Izarra, por su dedicación y por sus brillantes e inagotables ideas. Luis, muchas gracias por tu paciencia (casi) infinita, por contagiarme tu entusiasmo por la investigación, por tu optimismo constante. Gracias también a tí y a Pilar por los buenos ratos que, entre tortilla y tortilla, compartimos en Ås en el frío otoño noruego de 1997.

A mis compañeros exbacterio-clínicos Srta. Ana M. Suárez, Maribel y Jose Mari. Además de por su ayuda en el laboratorio y por su amistad, quisiera darles las gracias por otros motivos: a la Srta. Ana M. Suárez por enseñarme, entre otras muchas cosas, que "la esterilidad es un ente abstracto"; a Maribel, por nuestras conversaciones trascendentes y por su particular visión del mundo; y a Jose Mari, por sus disparates sin igual, y, como no, por sus sonetos pipetos. Thank you to Sanghamitra Mukhopadhyay, my labmate in the fight against enterocins during the first year, who became a good friend of mine. Gracias también a los nuevos adiestradores de enterococos, Jorge, Raquel, Rosanna y Alicia Rico por su simpatía.

A todos los compañeros del Departamento, becarios y objetores, por contribuir a que la larga jornada de trabajo fuera más agradable. Quisiera hacer una especial mención a los "viejos dinosaurios" (grupo en el que, por supuesto, me incluyo): Adrián, Isabela, Esterilla y Begoña, por el enorme gusto de haberlos tenido como compañeros de trabajo y, sobre todo, por seguir teniéndolos como buenos amigos. También un agradecimiento especial a Alicia Fernández, esa duendecilla bienhumorada y optimista, compañera de andanzas laborales y mundanas, y a Adriana Zabala, por su amistad y sus consejos. Asimismo, gracias a todos los profesores y resto del personal del Departamento, en especial a

personal del Departamento, en especial a Paloma Morales y María Marín; muchas gracias también a Carmen Pin por servirme de guía en el intrincado mundo de la Estadística.

I would like to thank Dr. Ingolf F. Nes (Laboratory of Microbial Gene Technology, Agricultural University of Norway, Ås, Noruega) for accepting me in his lab from October to December 1997, and to everybody in LMG, especially to Anne-Siri, Ågot, Grethe and Danny Doan. Thank you to Andrea Lauková (Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia) for making my stay in Norway much more pleasant.

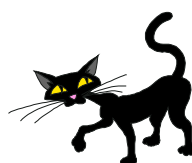
I would like to express my gratitude to Dr. T. J. Montville (Department of Food Science, Cook College, Rutgers, The State University of New Jersey, New Jersey, EEUU) for giving me the great opportunity to work in his lab from October to December 1998. Thank you very much to Dr. Michael T. Chikindas and to Dr. Yuhuan Chen, for guiding me scientifically, and personally, during my stay in New Jersey, and to all the nice people I met there, especially my labmates Apostolos, Hyung-Jung, Max, and Stalo.

I would also like to thank Dr. Arnold J. M. Driessen (Department of Molecular Microbiology, University of Groningen, Groningen, Holanda) for conceding me the privilege to work in his lab from October to December 1999, and to Dr. Gert N. Moll and Dr. Jelto Swaving for sharing their vast scientific knowledge with me. Thank you to everybody in the Department for their unconditional help, especially to Ted & Theo, and to Abelardo, Gert, Monika, Paolo, Piotr and Yolanda for the nice time we spent together in Groningen.

Asimismo, quiero agradecer al Ministerio de Educación y Cultura la concesión de una beca predoctoral de cuatro años de duración, y la de dos estancias cortas en Europa y una en Estados Unidos, que han contribuido enormemente a mi formación científica y humana.

Muchas gracias a mis "amigos incondicionales" Gema, Mari Carmen y Yolanda, por quitarle hierro al asunto y por estar siempre a mi lado, y a mis compañeras de alegrías y pesares durante y después de la licenciatura de Veterinaria, Gema, María, Miryam y Rosa; no me olvido tampoco de otras "sufridoras indirectas", como Marian y Susana.

Finalmente, muchísimas gracias a mi familia, sobre todo a mi madre, por mostrar interés por mi trabajo y por sufrirme con tanta paciencia. Paolo, tantissime grazie per la tua comprensione, il tuo appoggio é l'affetto che mi hai sempre dato. Senza di té, sarebbe stato piú difficile.



*La fantasía abandonada de la  
razón produce monstruos, pero unida  
a ella es la madre de las artes*

*Francisco de Goya*

*En cuestiones de ciencia, la  
autoridad de mil no vale tanto como  
el humilde razonamiento de un solo  
individuo*

*Galileo Galilei*

*Un experto es alguien que ya ha  
cometido todos los errores posibles en  
una materia muy concreta*

*Niels Henrik David Bohr*





## *ÍNDICE*



<b>CAPÍTULO I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>5</b>
<b>II.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS .....</b>	<b>7</b>
II.1.1. EL GÉNERO <i>Enterococcus</i> .....	7
II.1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS. BIOCONSERVACIÓN .....	10
<b>II.2. BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS .....</b>	<b>13</b>
II.2.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN .....	13
II.2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	17
II.2.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA .....	19
II.2.4. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS .....	20
II.2.4.1. Gen estructural .....	24
II.2.4.2. Gen de inmunidad .....	27
II.2.4.3. Genes de procesamiento y transporte .....	28
II.2.4.4. Genes implicados en la regulación de la biosíntesis .....	28
II.2.4.4.1. Características generales de los sistemas de regulación de la biosíntesis .....	29
II.2.4.4.2. La feromona o factor de inducción .....	30
<b>II.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS .....</b>	<b>32</b>
<b>II.4. MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LAS BACTERIOCINAS .....</b>	<b>36</b>
II.4.1. SISTEMAS DE SECRECIÓN DEL TIPO ABC .....	36
II.4.2. SISTEMAS DE SECRECIÓN <i>sec</i> -DEPENDIENTES .....	41
II.4.2.1. El péptido señal .....	43
II.4.2.2. SecB .....	43
II.4.2.3. SecA .....	44
II.4.2.4. Componentes integrales de membrana de la translocasa .....	44
II.4.2.5. Mecanismo de translocación proteica .....	45
<b>II.5. MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIOCINAS Y DE OTROS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL .....</b>	<b>47</b>
II.5.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EUCARIÓTICOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL .....	48
II.5.1.1 Estructura proteica .....	48
II.5.1.2. Relaciones estructura-función .....	48
II.5.1.3. Modelos propuestos para explicar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos .....	51
II.5.1.3.1. Modelo de haces de hélices transmembrana .....	55

II.5.1.3.2. Modelo toroidal .....	55
II.5.1.3.3. Modelo de “alfombra” .....	57
II.5.1.3.4. Modelo de difusión en el plano .....	58
II.5.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PROCARIÓTICOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL: LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS .....	58
II.5.2.1. Nisina .....	59
II.5.2.2. Bacteriocinas de la clase II .....	61
 <b>CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE TRES CEPAS BACTERIOCINOGENICAS DE <i>E. faecium</i> AISLADAS DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE SUS BACTERIOCINAS</b> .....	67
 <b>III.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	69
 <b>III.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	70
III.2.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGENICAS DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS ESPAÑOLES .....	70
III.2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS INDICADORES .....	70
III.2.2.1. Obtención de sobrenadantes libres de células .....	70
III.2.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar .....	70
III.2.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR CRUZADA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS E INMUNIDAD A SUS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES .....	71
III.2.4. ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES PRODUCIDAS POR <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	71
III.2.4.1. Efecto de enzimas proteolíticos, glucolíticos y lipolíticos .....	73
III.2.4.2. Efecto del pH .....	73
III.2.4.3. Efecto de la temperatura .....	73
III.2.4.4. Cuantificación de la actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras .....	74
III.2.5. EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MRS, BHI Y APT PARA LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	74

III.2.6. CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 EN CALDO MRS .....	75
III.2.7. PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD DE LAS BACTERIOCINAS DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21. DETERMINACIÓN DE SU SECUENCIA AMINOACÍDICA .....	75
III.2.7.1. Protocolo de purificación .....	75
III.2.7.2. Determinación de la secuencia aminoacídica de las bacteriocinas .....	77
III.2.8. AISLAMIENTO Y VISUALIZACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO Y CROMOSÓMICO DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	78
III.2.8.1. Aislamiento del DNA plasmídico y cromosómico .....	78
III.2.8.2. Visualización del DNA plasmídico y cromosómico .....	80
III.2.9. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENTEROCINA P DE <i>E. faecium</i> AA13 Y <i>E. faecium</i> G16 Y DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE <i>E. faecium</i> P21. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR .....	80
III.2.9.1. Oligonucleótidos sintéticos o cebadores .....	81
III.2.9.2. Reacciones de amplificación del DNA mediante PCR específico .....	81
III.2.9.3. Visualización y análisis de los productos de PCR .....	83
III.2.9.4. Secuenciación de los productos de PCR .....	83
III.2.10. ANÁLISIS GENÉTICO PARCIAL DEL OPERÓN DE LA ENTEROCINA P DE <i>E. faecium</i> AA13 Y <i>E. faecium</i> G16 Y DE LOS OPERONES DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE <i>E. faecium</i> P21. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES ESTRUCTURALES DE BACTERIOCINAS DEL TIPO PEDIOCINA DIFERENTES DE LAS ENTEROCINAS P, A Y B .....	84
III.2.10.1. Restricción del DNA total de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	84
III.2.10.2. Restricción del vector fagémido pBluescript II SK + .....	84
III.2.10.3. Ligación de los fragmentos de restricción del DNA total de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 en el vector pBluescript II SK + .....	85
III.2.10.4. Amplificación de regiones del genoma de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 mediante PCR hemiespecífico y PCR anidado .....	85
III.2.11. SERVIDORES Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS .....	86

<b>III.3. RESULTADOS</b> .....	88
III.3.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS INDICADORES .....	88
III.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR CRUZADA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS E INMUNIDAD A SUS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS .....	88
III.3.3. ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES PRODUCIDAS POR <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	90
III.3.4. EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MRS, BHI Y APT PARA LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	92
III.3.5. CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 EN CALDO MRS .....	93
III.3.6. PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD DE LAS BACTERIOCINAS DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21. DETERMINACIÓN DE SU SECUENCIA AMINOACÍDICA .....	94
III.3.7. AISLAMIENTO Y VISUALIZACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO Y CROMOSÓMICO DE <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	103
III.3.8. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENTEROCINA P EN <i>E. faecium</i> AA13 Y <i>E. faecium</i> G16 Y DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LAS ENTEROCINAS A Y B EN <i>E. faecium</i> P21. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR .....	103
III.3.9. ANÁLISIS GENÉTICO PARCIAL DEL OPERÓN DE LA ENTEROCINA P DE <i>E. faecium</i> AA13 Y <i>E. faecium</i> G16 Y DE LOS OPERONES DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE <i>E. faecium</i> P21. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES ESTRUCTURALES DE BACTERIOCINAS DE LA FAMILIA DE LA PEDIOCINA DISTINTAS A LAS ENTEROCINAS P Y A .....	108
III.3.9.1. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3' del DNA de <i>E. faecium</i> G16 .....	108
III.3.9.2. Avance de la secuenciación hacia el extremo 5' del DNA de <i>E. faecium</i> G16 .....	110
III.3.9.3. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3' del DNA de <i>E. faecium</i> P21 .....	110
III.3.9.4. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3' del DNA de <i>E. faecium</i> P21 .....	112
III.3.9.5. Estudio de la presencia de genes estructurales que codifiquen bacteriocinas del tipo pediocina distintas de las enterocinas P y A .....	112

<b>III.4. DISCUSIÓN</b>	115
III.4.1. PRODUCCIÓN DE ENTEROCINAS DE AMPLIO ESPECTRO POR CEPAS DE <i>E. faecium</i> AISLADAS DE LOS ALIMENTOS	115
III.4.1.1. Aislamiento e identificación de <i>E. faecium</i> aislados de los alimentos y otras fuentes. Potencial patógeno del género <i>Enterococcus</i>	115
III.4.1.2. Espectro de acción, inmunidad y actividad antimicrobiana cruzada de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21	117
III.4.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 Y <i>E. faecium</i> P21	119
III.4.2.1. Estabilidad físico-química de las sustancias antimicrobianas exocelulares producidas por <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21	119
III.4.2.2. Evaluación de los medios de cultivo MRS, BHI y APT para la producción/detección de las sustancias antimicrobianas exocelulares de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21	121
III.4.2.3. Purificación a homogeneidad de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21. Determinación de su secuencia aminoacídica	123
III.4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA PARCIAL DE LA ENTEROCINA P DE <i>E. faecium</i> AA13 Y <i>E. faecium</i> G16 Y DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE <i>E. faecium</i> P21	127
III.4.3.1. Análisis del operón de la enterocina P de <i>E. faecium</i> AA13 y <i>E. faecium</i> G16	128
III.4.3.2. Análisis de los operones de las enterocinas A y B de <i>E. faecium</i> P21	129
III.4.3.3. Búsqueda de genes que codifiquen bacteriocinas del tipo pediocina distintas de las enterocinas P y A	140
<b>CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P POR <i>E. faecium</i> P13</b>	143
<b>IV.1. INTRODUCCIÓN</b>	145
<b>IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	147
IV.2.1. INFLUENCIA DEL pH INICIAL DEL CALDO MRS EN EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 Y EN LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P	147
IV.2.2. INFLUENCIA DEL NaCl Y DEL ETANOL EN EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 Y EN LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P	147
IV.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENTEROCINA P DE <i>E. faecium</i> P13	148
IV.2.3.1. Modelado del crecimiento de <i>E. faecium</i> P13	149

IV.2.3.2. Modelado de la producción e inactivación de la enterocina P .....	150
IV.2.4. ADSORCIÓN DE LA ENTEROCINA P A LAS CÉLULAS DE <i>E. faecium</i> P13 Y EXTRACCIÓN DE LA ENTEROCINA P ADSORBIDA .....	150
IV.2.4.1. Adsorción de la enterocina P a las células productoras a distintos valores de pH .....	150
IV.2.4.2. Extracción de la enterocina P de las células productoras .....	151
IV.2.5. INFLUENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P .....	151
IV.2.6. EFECTO COMBINADO DEL pH Y DE LOS COMPUESTOS ORIGINADOS DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 EN CALDO MRS EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P .....	152
IV.2.7. CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 Y PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P EN CALDO BHI SUPLEMENTADO CON SOBRENADANTES ACTIVOS DE <i>E. faecium</i> P13.....	152
<b>IV.3. RESULTADOS</b> .....	154
IV.3.1. INFLUENCIA DEL pH INICIAL DEL CALDO MRS EN EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 Y EN LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P .....	154
IV.3.2. INFLUENCIA DEL NaCl Y DEL ETANOL EN EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 Y EN LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P .....	158
IV.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENTEROCINA P DE <i>E. faecium</i> P13 .....	162
IV.3.3.1. Crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado en un fermentador a pH constante .....	162
IV.3.3.2. Modelado del crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 en un fermentador con regulación del pH .....	168
IV.3.3.3. Modelado de la producción de enterocina P y de su inactivación .....	171
IV.3.4. ADSORCIÓN DE LA ENTEROCINA P A LAS CÉLULAS DE <i>E. faecium</i> P13 Y EXTRACCIÓN DE LA ENTEROCINA P ADSORBIDA .....	173
IV.3.5. INFLUENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P .....	174
IV.3.6. EFECTO COMBINADO DEL pH Y DE LOS COMPUESTOS ORIGINADOS DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 EN CALDO MRS EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P .....	175



IV.3.7. CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 Y PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P EN CALDO BHI SUPLEMENTADO CON SOBRENADANTES ACTIVOS DE <i>E. faecium</i> P13.....	176
<b>IV.4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>178</b>
IV.4.1. INFLUENCIA DEL pH INICIAL DEL CALDO MRS Y DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl Y ETANOL EN EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 Y EN LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P .....	178
IV. 4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P MEDIANTE EL CRECIMIENTO DE <i>E. faecium</i> P13 BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE pH EN UN FERMENTADOR .....	181
IV.4.2.1. Crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 y producción de enterocina P en un fermentador sin regulación del pH .....	181
IV.4.2.2. Condiciones de los cultivos de <i>E. faecium</i> P13 en un fermentador con regulación del pH .....	182
IV.4.2.2.1 Temperatura .....	182
IV.4.2.2.2. Tensión de oxígeno .....	183
IV.4.2.2.3. Medio de cultivo .....	183
IV.4.2.2.4. pH .....	183
IV.4.2.3. Crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 en un fermentador con regulación del pH .....	184
IV.4.2.4. Producción e inactivación de la enterocina P producida por <i>E. faecium</i> P13 en un fermentador con regulación del pH .....	185
IV.4.2.5. Metabolismo de la glucosa en <i>E. faecium</i> P13 desarrollado en un fermentador con regulación del pH .....	189
IV.4.3. EFECTO DE SOBRENADANTES ACTIVOS DE <i>E. faecium</i> P13 EN SU CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P EN CALDO BHI .....	192
<b>V. MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P .....</b>	<b>195</b>
<b>V.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>197</b>
<b>V.2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>199</b>
V.2.1. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LA VIABILIDAD DE CULTIVOS DE <i>E. faecium</i> T136 .....	199
V.2.2. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS NIVELES INTRA- Y EXTRACELULARES DE ATP .....	200
V.2.3. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL TRANSPORTE DE SUSTRATOS RADIATIVOS EN CÉLULAS DE <i>E. faecium</i> T136 .....	201

V.2.4. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS COMPONENTES DE LA FUERZA PROTÓN MOTRIZ ...	203
V.2.4.1. Efecto de la enterocina P en el gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) de células de <i>E. faecium</i> T136 .....	203
V.2.4.2. Efecto de la enterocina P en el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de células de <i>E. faecium</i> T136 .....	204
V.2.5. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL MOVIMIENTO TRANSMEMBRANA DE IONES $\text{K}^+$ .....	205
V.2.6. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LIPOSOMAS .....	206
V.2.6.1. Efecto de la enterocina P en liposomas de <i>E. faecium</i> T136 cargados de carboxifluoresceína .....	206
V.2.6.1.1. Aislamiento de los lípidos totales de <i>E. faecium</i> T136 .....	206
V.2.6.1.2. Preparación de liposomas cargados de carboxifluoresceína mediante cromatografía de filtración en geles .....	207
V.2.6.1.3. Efecto de la enterocina P en liposomas cargados de carboxifluoresceína.....	208
V.2.6.2. Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos cargados de $\text{Rb}^{86}$ o $\text{K}^+$ .....	208
V.2.6.2.1. Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos cargados de $\text{Rb}^{86}$ .....	208
V.2.6.2.2. Efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de iones $\text{K}^+$ en liposomas sintéticos .....	209
<b>V.3. RESULTADOS</b> .....	211
V.3.1. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LA VIABILIDAD DE CULTIVOS DE <i>E. faecium</i> T136 .....	211
V.3.2. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS NIVELES INTRA- Y EXTRACELULARES DE ATP .....	213
V.3.3. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL TRANSPORTE DE SUSTRATOS RADIATIVOS EN CÉLULAS DE <i>E. faecium</i> T136 .....	214
V.3.4. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS COMPONENTES DE LA FUERZA PROTÓN MOTRIZ ...	216
V.3.4.1. Efecto de la enterocina P en el gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) de células de <i>E. faecium</i> T136 .....	216
V.3.4.2. Efecto de la enterocina P en el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de células de <i>E. faecium</i> T136 .....	217
V.3.5. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL MOVIMIENTO TRANSMEMBRANA DE IONES $\text{K}^+$ EN CÉLULAS DE <i>E. faecium</i> T136 .....	217
V.3.6. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LIPOSOMAS .....	219
V.3.6.1. Efecto de la enterocina P en liposomas de <i>E. faecium</i> T136 cargados de carboxifluoresceína .....	219
V.3.6.2. Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos cargados de $\text{Rb}^{86}$ .....	220
V.3.6.3. Efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de iones $\text{K}^+$ en liposomas sintéticos .....	220

<b>V.4. DISCUSIÓN</b>	223
V.4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P EN CÉLULAS DE <i>E. faecium</i> T136	223
V.4.2. MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P EN LIPOSOMAS	230
<b>CAPÍTULO VI. ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO Y SECRECIÓN DE LA ENTEROCINA P MEDIANTE LA RUTA GENERAL DE SECRECIÓN</b>	233
<b>VI.1. INTRODUCCIÓN</b>	235
<b>VI.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	236
VI.2.1. CLONACIÓN DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENTEROCINA P DE <i>E. faecium</i> P13 EN <i>E. coli</i>	236
VI.2.1.1. Aislamiento y visualización del DNA total de <i>E. faecium</i> P13	236
VI.2.1.2. Amplificación mediante PCR del gen de la preproenterocina P de <i>E. faecium</i> P13	236
VI.2.1.3. Restricción del producto de PCR obtenido con los cebadores EntP-F y EntP-R y del vector pET401	237
VI.2.1.4. Ligación de los fragmentos de restricción en el vector pET401 digerido con <i>KpnI</i> y <i>EcoRI</i>	238
VI.2.1.5. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con el vector pET1899	238
VI.2.1.6. Aislamiento del vector pET1899	238
VI.2.2. EXPRESIÓN <i>in vitro</i> DE LA PREPROENTEROCINA P	240
VI.2.2.1. Reacciones de transcripción/traducción <i>in vitro</i>	240
VI.2.2.2. Análisis de los resultados de las reacciones de transcripción/traducción <i>in vitro</i>	241
VI.2.2.2.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS y tricina	241
VI.2.2.2.2. Autorradiografía	242
VI.2.3. TRANSLOCACIÓN Y/O PROCESAMIENTO <i>in vitro</i> DE LA PREPROENTEROCINA P	242
VI.2.3.1. Aislamiento de vesículas de la membrana interna de <i>E. coli</i>	242
VI.2.3.2. Ensayo de translocación <i>in vitro</i> de la preproenterocina P empleando la maquinaria de translocación de <i>E. coli</i>	243
VI.2.3.3. Otros ensayos de procesamiento y/o translocación de la preproenterocina P	244
VI.2.3.3.1. Ensayos de transcripción-traducción-translocación <i>in vitro</i> acopladas	244
VI.2.3.3.2. Ensayo del procesamiento de la preproenterocina P por las peptidasas líder de <i>E. coli</i> y de <i>B. subtilis</i>	245

<b>VI.3. RESULTADOS</b>	246
VI.3.1. CLONACIÓN DE <i>entP</i> Y EXPRESIÓN <i>in vitro</i> DE LA PREPROENTEROCINA P	246
VI.3.2. ENSAYOS DE TRANSLOCACIÓN <i>in vitro</i> DE LA PREPROENTEROCINA P	247
VI.3.3. ENSAYOS DEL PROCESAMIENTO <i>in vitro</i> DE LA PREPROENTEROCINA P POR LAS PEPTIDASAS LÍDER DE <i>E. coli</i> Y DE <i>B. subtilis</i>	249
<b>VI.4. DISCUSIÓN</b>	252
VI.4.1. CARACTERÍSTICAS DEL PÉPTIDO SEÑAL DE LA ENTEROCINA P	252
VI.4.2. TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE LA ENTEROCINA P POR SISTEMAS <i>sec</i> -DEPENDIENTES HETERÓLOGOS	255
VI.4.3. IMPLICACIONES DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE EN LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS	260
<b>CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS</b>	263
<b>CAPÍTULO VIII. TRABAJO FUTURO</b>	269
<b>CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	273
<b>APÉNDICES</b>	321
1. ABREVIATURAS	323
2. ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS Y CÓDIGO GENÉTICO	326
3. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	327

## *CAPÍTULO I*

*EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR Y DE  
LOS OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN*



Las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se aíslan frecuentemente de los alimentos fermentados, en los que favorecen el desarrollo de sus características organolépticas típicas y/o aumentan sus cualidades nutritivas. Además, contribuyen a la adecuada calidad higiénica de estos alimentos mediante diversos mecanismos de antagonismo microbiano, como la competencia por los nutrientes presentes en el sustrato y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, entre los que se encuentran las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal. El espectro de acción antimicrobiana de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas es amplio e incluye microorganismos patógenos y/o alterantes de los alimentos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*.

La aparente inocuidad de las bacteriocinas de las bacterias lácticas que, seguramente, han sido y son consumidas (junto con las bacterias productoras) a través de los alimentos fermentados, unida a su actividad antimicrobiana, permitiría el empleo de estas moléculas como bioconservantes alimentarios. En la actualidad únicamente la nisina, una bacteriocina de tipo lantibiótico producida por diversas cepas de *Lactococcus lactis*, se encuentra permitida como aditivo en la industria alimentaria; no obstante también existe la posibilidad de emplear las bacteriocinas en forma de fermentados como sucede con la pediocina PA-1, contenida en el ingrediente alimentario ALTA 2341™. En cualquier caso, el interés de la industria alimentaria por satisfacer la demanda de los consumidores de productos más “naturales” y con menos aditivos químicos sugiere que muchas otras bacteriocinas podrían emplearse en el futuro como bioconservantes. En este sentido, las bacteriocinas (enterocinas) producidas por algunas cepas del género *Enterococcus* resultan particularmente prometedoras debido a su potente espectro antimicrobiano que, en la mayoría de los casos, incluye a *Ls. monocytogenes*, un patógeno emergente que constituye un serio peligro para la Salud Pública.

El empleo de las bacteriocinas como bioconservantes en la industria alimentaria requiere, entre otros aspectos, una caracterización detallada de las mismas en lo que se refiere a sus características físico-químicas y genéticas, a las condiciones óptimas para su producción y a su mecanismo de acción y secreción. En este contexto, los objetivos de este trabajo de investigación fueron los siguientes:

- 1) Caracterización de las propiedades físico-químicas y del espectro de acción antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por tres cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de embutidos crudos curados (chorizos) elaborados artesanalmente en distintas localidades de España.

- 2) Purificación a homogeneidad de las bacteriocinas mediante diversas técnicas cromatográficas y determinación de su secuencia aminoacídica.
- 3) Obtención, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de fragmentos de ADN que contengan los determinantes genéticos de la producción de las bacteriocinas. Secuenciación de los productos de PCR y determinación de la secuencia nucleotídica de regiones relacionadas con la producción de las mismas.
- 4) Determinación de las condiciones experimentales óptimas para la producción de enterocina P por *E. faecium* P13 mediante su crecimiento en un fermentador bajo condiciones controladas de temperatura, presión de oxígeno, agitación y pH.
- 5) Evaluación del mecanismo molecular de acción de la enterocina P en células de *E. faecium* T136, así como en liposomas derivados de este microorganismo indicador y en liposomas sintéticos elaborados con dioleil-glicero-fosfatidilcolina y dioleil-glicero-fosfatidilglicerol.
- 6) Estudio del procesamiento y la secreción *in vitro* de la preproenterocina P empleando la Ruta General de Secreción (GSP) de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.



## *CAPÍTULO II*

### *INTRODUCCIÓN GENERAL*



## II.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos Gram-positivos muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico y fisiológico, con necesidades nutritivas complejas y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de un metabolismo estrictamente fermentativo de los carbohidratos. En general, son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, de carácter microaerófilico o anaerobio facultativo, carecen de citocromos y catalasa *sensu stricto*, y presentan un contenido en guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol %. En la actualidad, las bacterias lácticas comprenden, además de los cuatro géneros tradicionales *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Axelsson, 1998; Cintas *et al.*, 2000d).

Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno (Aguirre y Collins, 1993), como, por ejemplo, leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas y ensilados (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996). Además, algunos géneros son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y urogenital de la especie humana y de algunos animales (Aguirre y Collins, 1993; Axelsson, 1998).

Debido a que las bacteriocinas caracterizadas en este trabajo son producidas por bacterias lácticas del género *Enterococcus*, a continuación se describen las características más relevantes de este género. Asimismo, en secciones posteriores se describirán las principales características físico-químicas, biológicas y genéticas de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, con especial mención a las enterocinas producidas por *E. faecium*.

### II.1.1. EL GÉNERO *Enterococcus*

El género *Enterococcus*, previamente sugerido por Thiercelin y Jouhaud (1903), Sherman (1937) y Kalina (1970), fue propuesto de nuevo por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) para acomodar taxonómicamente a las especies *Streptococcus faecalis* y *S. faecium*. Como se observa en la Tabla II.1, el género consta en la actualidad de 19 especies que, en base a los estudios

**Tabla II.1 Especies incluidas en el género *Enterococcus***

Grupo	Especies	Fuente original	Referencia
<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	Aislados clínicos	Collins <i>et al.</i> (1984)
	<i>E. faecium</i>	TGI <sup>a</sup> del hombre y de algunos animales	Schleifer y Kilpper-Bälz (1984)
	<i>E. hirae</i>	TGI de animales	Farrow y Collins (1985)
	<i>E. mundtii</i>	Hierba, ensilados, plantas, suelo	Collins <i>et al.</i> (1986)
<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i>	Aves y TGI <sup>a</sup> de mamíferos	Collins <i>et al.</i> (1984)
	<i>E. malodoratus</i>	Queso <i>Gouda</i>	Collins <i>et al.</i> (1984)
	<i>E. pseudoavium</i>	Mastitis bovinas	Collins <i>et al.</i> (1989)
	<i>E. raffinosus</i>	Aislados clínicos, endocarditis	Collins <i>et al.</i> (1989)
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Hierba, ensilados, plantas, suelo	Collins <i>et al.</i> (1984)
	<i>E. flavescens</i>	Aislados clínicos	Pompei <i>et al.</i> (1992)
	<i>E. gallinarum</i>	TGI <sup>a</sup> de aves	Collins <i>et al.</i> (1984)
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i>	Aislados clínicos, animales	Williams <i>et al.</i> (1989)
	<i>E. columbae</i>	TGI <sup>a</sup> de palomas	Devriese <i>et al.</i> (1990)
Otros	<i>E. dispar</i>	Hombre	Collins <i>et al.</i> (1991)
	<i>E. faecalis</i>	TGI <sup>a</sup> del hombre y de algunos animales	Schleifer y Kilpper-Bälz (1984)
	<i>E. saccharolyticus</i>	Camas y piel del ganado	Rodrigues y Collins (1990)
	<i>E. seriolicida</i> <sup>b</sup>	Peces	Kusuda <i>et al.</i> (1991)
	<i>E. solitarius</i> <sup>c</sup>	ND	Williams <i>et al.</i> (1991)
	<i>E. sulfureus</i>	Plantas	Martínez-Murcia y Collins (1991)

<sup>a</sup>Tracto gastrointestinal; <sup>b</sup>Presenta un 100 % de similitud de la fracción 16S del rRNA con *Lactococcus garvieae*;

<sup>c</sup>Desde el punto de vista filogenético, está más próximo al género *Tetragenococcus*; ND, no determinado.

Adaptada de Devriese y Pot (1995), Hardie y Whiley (1997) y Stiles y Holzapfel (1997)

comparativos de la fracción 16S del rRNA, se han dividido en cuatro grupos: (i) *E. faecium*, (ii) *E. avium* (iii) *E. gallinarum* y (iv) *E. cecorum*. Algunas especies, como la especie tipo del género, *E. faecalis*, forman líneas independientes y no se incluyen en ninguno de los grupos previos (Devriese y Pot, 1995; Hardie y Whiley, 1997).

A pesar de la ausencia de criterios fenotípicos que permitan distinguir inequívocamente a los miembros del género *Enterococcus* de otros cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos y catalasa-negativos, los microorganismos capaces de crecer a 10 y 45°C, en caldo con NaCl al 6,5% (p/v), a pH 9,6 y en medios con un 0,04% (p/v) de azida de sodio pueden clasificarse preliminarmente dentro de este género (Devriese y Pot, 1995).

El género *Enterococcus* forma parte de la flora habitual del tracto gastrointestinal de la especie humana y de algunos animales; en este contexto, *E. faecalis* y *E. faecium* se aíslan de la práctica totalidad de las muestras de heces humanas, así como del tracto gastrointestinal de rumiantes, cerdos, aves, perros, gatos y de algunos mamíferos salvajes (Devriese y Pot, 1995; Hardie y Whiley, 1997). Asimismo, los enterococos, particularmente *E. faecium*, se han aislado de numerosos alimentos, tales como leche y productos lácteos (Farias *et al.*, 1994; Giraffa *et al.*, 1994; Olasupo *et al.*, 1994; Vlaenmyck *et al.*, 1994; Ennahar *et al.*, 1998), embutidos crudos curados (Devriese *et al.*, 1995; Cintas, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998), vegetales y ensilados (Vlaenmyck *et al.*, 1994; Ohmomo *et al.*, 2000), aceitunas (Franz *et al.*, 1996; Floriano *et al.*, 1998), y pescado (Ben Embarek *et al.*, 1994). Además, se han aislado especies del género *Enterococcus* del suelo, agua, plantas, insectos, etc., lo que pone de manifiesto que estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Facklam y Sahm, 1995; Giraffa *et al.*, 1997) (Tabla II.1).

En los últimos años, el potencial patógeno de los enterococos ha sido frecuentemente objeto de debate (Aguirre y Collins, 1993; Giraffa *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998). En este contexto, los enterococos, particularmente *E. faecalis*, se han asociado con infecciones nosocomiales intraabdominales, pélvicas y genitourinarias, endocarditis y meningitis en la especie humana (Murray, 1990; Moellering, 1991; Aguirre y Collins, 1993); no obstante, su significado en la etiología de infecciones polimicrobianas no se ha elucidado aún completamente (Aguirre y Collins, 1993; Low *et al.*, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997). La adquisición de resistencia a antibióticos, particularmente por los enterococos asociados a las infecciones nosocomiales, es un hecho preocupante (Facklam y Sahm, 1995; Giraffa *et al.*, 1997; Hardie y Whiley, 1997; Klein *et al.*, 1998). Dado que existe un número considerable de enterococos que son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y aminoglicosídicos (Herman *et al.*, 1991; Boyce *et al.*, 1992; Low *et al.*, 1994), el

tratamiento de elección de las enfermedades causadas por estos patógenos son los antibióticos glicopéptidicos (vancomicina y teicoplanina) (Klein *et al.*, 1998). No obstante, también se ha detectado una tendencia creciente en la resistencia a vancomicina de los enterococos aislados de infecciones nosocomiales (Moellering, 1991; Leclercq *et al.*, 1992; Aguirre y Collins, 1993). La resistencia a los glicopéptidos resulta de la transferencia de determinantes genéticos generalmente localizados en transposones relacionados con Tn1546 (Clewell, 1990; Schlaes y Binczewski, 1990; Heaton *et al.*, 1996). A pesar de que la fuente de enterococos resistentes a glicopéptidos es desconocida (Klein *et al.*, 1998), los enterococos aislados de productos lácteos (Knudtson *et al.*, 1993; Miguel *et al.*, 1995) y de carne picada (Klein *et al.*, 1998) suelen presentar mayor sensibilidad a la mayoría de los antibióticos que los aislados de fuentes ambientales o clínicas, y estudios recientes mediante electroforesis en campo pulsado sugieren que los enterococos de origen clínico y los de origen alimentario no están genéticamente relacionados (Lemcke y Bülte, 1997). De hecho, los enterococos se utilizan como probióticos (Fuller, 1989; Gilliland, 1990), como cultivos iniciadores de ciertos tipos de quesos (Farias *et al.*, 1994; Giraffa *et al.*, 1994; Giraffa *et al.*, 1997) y ensilados (Nousiainen y Setälä, 1998) y se han consumido tradicionalmente sin un peligro conocido para la salud del hombre y de los animales (Adams y Marteau, 1995).

### **II.1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS. BIOCONSERVACIÓN**

Históricamente, las bacterias lácticas se han empleado de forma empírica en la elaboración de una gran variedad de productos fermentados de origen cárnico, lácteo y vegetal (Wood, 1985). Sin embargo, en las últimas décadas las fermentaciones industriales son procesos controlados estrictamente en los que se añaden cultivos iniciadores que permiten garantizar y estandarizar las características organolépticas del producto final, así como potenciar su calidad higiénico-sanitaria (Smith y Palumbo, 1981). En este contexto, las bacterias lácticas poseen una gran importancia, ya que su actividad metabólica origina una serie de compuestos, fundamentalmente el ácido láctico, que son fundamentales para que los productos fermentados adquieran sus características organolépticas típicas (Smith y Palumbo, 1981; Hammes *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 1993; Stiles, 1996). Además de un papel tecnológico, las bacterias lácticas desempeñan una función higiénica en los alimentos debido a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas (Klaenhammer, 1988; Hernández *et al.*, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Muriana, 1996; Stiles,

1996; Aymerich y Hugas, 1998). Entre estos metabolitos se encuentran: los ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno, el dióxido de carbono, el diacetilo, la reuterina y las bacteriocinas (Adams y Halls, 1988; Axelsson *et al.*, 1989; Piard y Desmazeaud, 1992; Ray y Daeschel, 1992; Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996; Ouwehand, 1998; Cintas *et al.*, 2000a ).

En los últimos años, la demanda de los consumidores se ha dirigido hacia alimentos más “naturales”, es decir, con un tratamiento industrial menos severo y libres de aditivos “artificiales” (Gould, 1992; Abee *et al.*, 1995), lo que ha conducido a la aparición de una nueva generación de productos mínimamente procesados (Stiles, 1996) y ha originado nuevos problemas de conservación (Winkowski *et al.*, 1993; Montville y Bruno, 1994; Aymerich y Hugas, 1998; Cintas y Casaús, 1998c). La pérdida potencial de seguridad de estos alimentos puede ser compensada, entre otras estrategias, por el empleo de antimicrobianos naturales (Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990; Hernández *et al.*, 1993; Gould *et al.*, 1996; Stiles, 1996). En este contexto, la bioconservación se define como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la actividad de su microflora natural o de sus metabolitos (Gould, 1992; Stiles, 1996; Aymerich y Hugas, 1998). Las bacteriocinas de las bacterias lácticas, especialmente aquellas activas frente a microorganismos alterantes de los alimentos y/o patógenos, como *Ls. monocytogenes*, *St. aureus* y *Cl. botulinum*, presentan un potencial bioconservante indiscutible (Gould, 1996; Mc Mullen y Stiles, 1996; Schillinger *et al.*, 1996; Cintas y Casaús, 1998c). Además, estas moléculas poseen otras características que favorecen su empleo como bioconservantes en la industria alimentaria, tales como: (i) la ausencia de actividad frente a células eucarióticas; (ii) su naturaleza proteica, que posibilita su inactivación por los enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal de los consumidores; y (iii) su termorresistencia (Hernández *et al.*, 1993; Nettles y Barefoot, 1993; Fields, 1996).

Para la aplicación de las bacteriocinas en los alimentos pueden seguirse tres estrategias: (i) inoculación del microorganismo productor y producción de la bacteriocina *in situ* (cultivo iniciador o protector); (ii) empleo de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica (ingrediente alimentario); y (iii) adición de la bacteriocina purificada o semipurificada (conservante alimentario) (Abee *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998). La aplicación comercial de las bacteriocinas como conservantes requiere su aceptación legal como aditivos alimentarios, y, en la actualidad, sólo la nisina está aceptada legalmente para este empleo (FDA, 1988; Vandenberg, 1993). Sin embargo, puesto que muchas bacterias lácticas pueden ser consideradas como microorganismos seguros o GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*), la producción *in situ*

de las bacteriocinas puede representar una alternativa interesante, pues no lleva asociada el coste adicional de su empleo como aditivo alimentario (Montville *et al.*, 1995; Gould, 1996; McAuliffe *et al.*, 1997; Schillinger *et al.*, 1996) y proporciona una fuente de bacteriocina más duradera (McMullen y Stiles, 1996). No obstante, en los alimentos existen una serie de factores que pueden ocasionar una reducción de la efectividad de las bacteriocinas, entre los que destacan: (i) la inactivación por componentes de los alimentos, como enzimas proteolíticos, o por su unión a partículas de grasa; (ii) la inestabilidad de la bacteriocina; (iii) la incapacidad de la cepa productora para producir suficiente cantidad de bacteriocina en el alimento y (iv) la aparición de microorganismos resistentes (Nettles y Barefoot, 1993; Schillinger *et al.*, 1996; Callewaert *et al.*, 2000). Por estas razones, se han propuesto una serie de estrategias para aumentar la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos, tales como la expresión heteróloga de los genes relacionados con la bacteriocinogenicidad en cultivos que forman parte de iniciadores, el diseño de *cassettes* génicos para la producción de múltiples bacteriocinas, la mutagénesis dirigida y las técnicas de ingeniería proteica (Klaenhammer, 1993; Nettles y Barefoot, 1993; Abee *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Schillinger *et al.*, 1996; Martínez, 1999; Martínez, 2000). Asimismo, el estudio de las propiedades físico-químicas, del mecanismo de acción y de la relación estructura-función de las bacteriocinas permitirían diseñar moléculas con una estabilidad y/o solubilidad mejoradas y un mayor espectro de actividad biológica (Nettles y Barefoot, 1993; Abee *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Schillinger *et al.*, 1996). Además, es necesario el desarrollo de métodos sensibles que permitan detectar y cuantificar bacteriocinas en los alimentos, independientemente de que se hayan añadido o de que se hayan producido *in situ* (McMullen y Stiles, 1996; Martínez, 2000).

En cualquier caso, las bacteriocinas deben considerarse como un factor adicional para asegurar la calidad y la seguridad de los alimentos. En este contexto, la “tecnología de los obstáculos” propone la conservación de los alimentos mediante la combinación de barreras físicas, químicas y biológicas, lo que permite reducir la intensidad de los tratamientos aplicados y/o la concentración de sustancias potencialmente peligrosas en los alimentos (Leistner y Gorris, 1995). En definitiva, la combinación de las bacteriocinas junto con otros métodos de conservación podría ser un sistema eficaz para inhibir el desarrollo de bacterias alterantes y/o patógenas en los alimentos (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Montville *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 2000b,c).



## II.2. BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

### II.2.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por bacterias Gram-positivas y negativas (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996; Nissen-Meyer y Nes, 1997) que pueden englobarse dentro de un grupo más amplio y heterogéneo de péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, que también comprende péptidos producidos por plantas, animales y hongos (Tabla II.2). Estos péptidos tienen en común su pequeño tamaño molecular, su naturaleza catiónica y anfipática o, en algunos casos, hidrofóbica, y su capacidad para interactuar con las membranas plasmáticas de las células sensibles (Montville y Kaiser, 1993; Hancock *et al.*, 1995; Nissen Meyer y Nes, 1997).

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas, como las colicinas de *E. coli*, poseen generalmente un tamaño molecular superior a 20 kDa (a excepción de la colicina V y de las microcinas de enterobacterias) y un espectro de acción antimicrobiana reducido a especies y cepas estrechamente relacionadas con la productora (Tagg *et al.*, 1976; Montville y Kaiser, 1993; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Por otra parte, las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas son en su mayoría péptidos de pequeño tamaño molecular (inferior a 6 kDa) y que varían considerablemente en su espectro de acción (Nissen-Meyer y Nes, 1997).

A pesar de la heterogeneidad de su tamaño molecular, propiedades bioquímicas, espectro de acción y organización genética, las bacteriocinas de las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes que permiten agruparlas en tres clases principales (Tabla II.3) (Nes *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1999a):

- 1) Clase I (lantibióticos): engloba bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y que contienen aminoácidos inusuales y modificados postraduccionalmente, como la deshidroalanina (Dha), la deshidrobutirina (Dhb), la lantionina (Lan) y la  $\beta$ -metil-lantionina (MeLan) (Sahl y Bierbaum, 1998; Moll *et al.*, 1999a). En función de su estructura, los lantibióticos se subdividen en: (i) Tipo A, péptidos formadores de poros, catiónicos y elongados, cuyo prototipo es la nisina; y (ii) Tipo B, péptidos globulares inmunológicamente activos que actúan como inhibidores de enzimas (Sahl *et al.*, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997).

Tabla II.2. Péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal eucarióticos y procarióticos

Origen	Ejemplos	Características generales
Mamíferos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Defensinas (Ganz y Lehrer, 1997)</li> <li>- Bactenecinas (Sitaram y Nagaraj, 1999)</li> <li>- Indolicidina (Sitaram y Nagaraj, 1999)</li> <li>- Plasmina seminal bovina (Sitaram y Nagaraj, 1999)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Residen en neutrófilos</li> <li>- Defensinas:               <ul style="list-style-type: none"> <li>{ ricas en Arg y Cys; poseen 3 puentes disulfuro</li> <li>{ estructura secundaria en lámina <math>\beta</math></li> <li>{ activas frente a bacterias, hongos, y virus</li> </ul> </li> </ul>
Insectos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cecropinas (Bechinger, 1997)</li> <li>- Otros: atacinas, dipterocinas, drosocina y defensinas</li> <li>- Péptidos de la abeja de la miel:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Melitina (Bechinger, 1997)</li> <li>Otros: abacina, apidacinas, himenoptacina y royalisina</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aislados de la hemolinfa</li> <li>- Cecropinas:               <ul style="list-style-type: none"> <li>{ síntesis inducible tras infección</li> <li>{ estructura secundaria en hélice <math>\alpha</math></li> <li>{ activas frente a bacterias Gram+ y Gram-</li> </ul> </li> <li>- Melitina:               <ul style="list-style-type: none"> <li>{ componente principal del veneno de abeja</li> <li>{ estructura secundaria en hélice <math>\alpha</math></li> <li>{ actividad antibacteriana y hemolítica</li> </ul> </li> </ul>
Anfibios	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dermaseptina (Mor y Nicholas, 1994)</li> <li>- Magaininas (Matsuzaki, 1999)</li> <li>- Otros: bombininas, brevininas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aislados de la piel y mucosa gástrica de ranas</li> <li>- Magaininas:               <ul style="list-style-type: none"> <li>{ estructura secundaria en hélice <math>\alpha</math></li> <li>{ activas frente a protozoos, bacterias y hongos</li> </ul> </li> </ul>
Plantas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tioninas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Péptidos ricos en Cys; homólogos a defensinas animales</li> <li>- Tóxicos para hongos; más activos frente a Gram +</li> </ul>
Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacteriocinas (Tagg <i>et al.</i>, 1976; Klaenhammer <i>et al.</i>, 1993; Jack <i>et al.</i>, 1995; Nes <i>et al.</i>, 1996)</li> </ul>	
Otros orígenes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alameticona (<i>Trichoderma viride</i>) (Bechinger, 1997)</li> <li>- Taquiplesinas y polifemusinas (cangrejos) (Matsuzaki, 1999)</li> <li>- Pardaxina (lenguados) (Sitaram y Nagaraj, 1999)</li> </ul>	

Adaptado de Hancock *et al.* (1995)

**Tabla II. 3. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas caracterizadas bioquímica y genéticamente**

Bacteriocina	Productor	Referencia(s)
<b>Clase I (lantibióticos)</b>		
Nisina A	<i>L. lactis</i>	Kaletta y Entian (1989)
Nisina Z	<i>L. lactis</i>	Mulders <i>et al.</i> (1991)
Salivaricina A	<i>S. salivarius</i> 20P3	Ross <i>et al.</i> (1993)
Estreptococcina A-FF22	<i>S. pyogenes</i> FF22	Hynes <i>et al.</i> (1993)
Lacticina 481 (a)	<i>L. lactis</i> CNRZ481	Piard <i>et al.</i> (1992)
Lactococcina DR (a)	<i>L. lactis</i> ADRIA85L030	Dufour <i>et al.</i> (1991)
Carnocina UI49	<i>C. piscicola</i> UI49	Stoffels <i>et al.</i> (1992)
Lactocina S	<i>Lb. sakei</i> L45	Mørtvedt <i>et al.</i> (1991)
Lacticina 3147 (A1 y A2)	<i>L. lactis</i> DPC3147	Dougherty <i>et al.</i> (1998)
<b>Clase II</b>		
<b>Clase IIa (bacteriocinas de la familia de la pediocina)</b>		
Pediocina PA1 (b)	<i>P. acidilactici</i> PAC-1.0	Henderson <i>et al.</i> (1992)
Pediocina AcH (b)	<i>P. acidilactici</i> H	Motlagh <i>et al.</i> (1992)
Leucocina A-UAL187	<i>Lc. gelidum</i> UAL187	Hastings <i>et al.</i> (1991)
Mesentericina Y105	<i>Lc. mesenteroides</i> Y105	Hécharde <i>et al.</i> (1992)
Sakacina A (c)	<i>Lb. sakei</i> LB706	Holck <i>et al.</i> (1992)
Curvacina A (c)	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	Tichaczek <i>et al.</i> (1992)
Sakacina P (d)	<i>Lb. sakei</i> LTH673	Tichaczek <i>et al.</i> (1992)
Sakacina 674 (d)	<i>Lb. sakei</i> LB674	Holck <i>et al.</i> (1994a)
Bavaricina A (d)	<i>Lb. bavaricus</i> MI401	Larsen <i>et al.</i> (1993)
Acidocina A	<i>Lb. acidophilus</i> TK9201	Kanatani <i>et al.</i> (1995)
Carnobacteriocina BM1	<i>C. piscicola</i> LV17B	Quadri <i>et al.</i> (1994)
Carnobacteriocina B2	<i>C. piscicola</i> LV17B	Quadri <i>et al.</i> (1994)
Enterocina A	<i>E. faecium</i> CTC492	Aymerich <i>et al.</i> (1996)
Mesentericina 52B	<i>Lc. mesenteroides</i> FR52	Hécharde <i>et al.</i> (1999)
Mesentericina B105	<i>Lc. mesenteroides</i> Y105	Revol-Junelles <i>et al.</i> (1996)
<b>Clase IIb (sistemas de dos péptidos)</b>		
Lactococcina M (LcnM y LcnN)	<i>L. cremoris</i> 9B4	Van Belkum <i>et al.</i> (1991a)
Lactococcina G (LcnG $\alpha$ y LcnG $\beta$ )	<i>L. lactis</i> LMG2081	Nissen-Meyer <i>et al.</i> (1992a)
Lactacina F (LafA y LafX)	<i>Lb. johnsonii</i> VPI11088	Allison <i>et al.</i> (1994)
Plantaricina S (Pls $\alpha$ y Pls $\beta$ )	<i>Lb. plantarum</i> LCPO10	Jiménez-Díaz <i>et al.</i> (1995)
Termofilina 13 (ThmA y ThmB)	<i>S. thermophilus</i> SFi13	Marciset <i>et al.</i> (1997)
Plantaricinas EF (PlnE y PlnF)	<i>Lb. plantarum</i> C11	Diep <i>et al.</i> (1996)
Plantaricinas JK (PlnJ y PlnK)	<i>Lb. plantarum</i> C11	Diep <i>et al.</i> (1996)
Acidocina J1132 ( $\alpha/\beta$ )	<i>Lb. acidophilus</i> JCM1132	Tahara <i>et al.</i> (1996b)
Leucocina H ( $\alpha$ y $\beta$ )	<i>Leuconostoc</i> sp. MF215B	Blom <i>et al.</i> (1999)

Tabla II. 3. (continuación)

Bacteriocina	Productor	Referencia(s)
<b>Clase IIc (bacteriocinas <i>sec</i>-dependientes)</b>		
Acidocina B	<i>Lb. acidophilus</i> M46	Leer <i>et al.</i> (1995)
Divergicina A	<i>Cb. divergens</i> LV13	Worobo <i>et al.</i> (1995)
Bacteriocina 31 <sup>*</sup>	<i>E. faecalis</i> Y117	Tomita <i>et al.</i> (1996)
Enterocina P <sup>*</sup>	<i>E. faecium</i> P13	Cintas <i>et al.</i> (1997)
Lactococcina 972	<i>L. lactis</i> IPLA972	Martínez <i>et al.</i> (1999)
<b>Clase IId (otras bacteriocinas)</b>		
Enterocina AS-48	<i>E. faecalis</i> S-48	Gálvez <i>et al.</i> (1986)
Lactococcinas A y B	<i>L. cremoris</i> 9B4	Van Belkum <i>et al.</i> (1991)
	<i>L. lactis</i> WM4	Stoddard <i>et al.</i> (1992)
	<i>L. cremoris</i> LMG2130	Holo <i>et al.</i> (1991)
Carnobacteriocina A (e)	<i>Cb. piscicola</i> LV17A	Worobo <i>et al.</i> (1994)
Piscicolina 61 (e)	<i>Cb. piscicola</i> LV61	Holck <i>et al.</i> (1994b)
Diacetina B	<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> UL720	Ali <i>et al.</i> (1995)
Acidocina 8912	<i>Lb. acidophilus</i> TK8192	Tahara <i>et al.</i> (1996a)
Divergicina 750	<i>Cb. divergens</i> 750	Holck <i>et al.</i> (1996)
Enterocina B	<i>E. faecium</i> T136	Casaus <i>et al.</i> (1997)
Lactobina A	<i>Lb. amylovorus</i> LMG P-13139	Contreras <i>et al.</i> (1997)
Gasericina B3	<i>Lb. gasseri</i> JCM2124	Tahara <i>et al.</i> (1997)
Peptido A	<i>Lb. acidophilus</i> LF221	Bogovic-Matijasic <i>et al.</i> (1998)
Peptido B	<i>Lb. acidophilus</i> LF221	Bogovic-Matijasic <i>et al.</i> (1998)
Enterocinas L50 (L50A y L50B) <sup>§</sup>	<i>E. faecium</i> L50	Cintas <i>et al.</i> (1998b)
Leucocina B-TA33a	<i>Lc. mesenteroides</i> TA33a	Papathanasopoulos <i>et al.</i> (1997)
Lactocina 705	<i>Lb. casei</i> CRL 705	Palacios <i>et al.</i> (1999)
Enterocina Q	<i>E. faecium</i> L50	Cintas <i>et al.</i> (2000b)
<b>Clase III</b>		
Helveticina J	<i>Lb. helveticus</i> 481	Joerger y Klaenhammer (1986)
Caseicina 80	<i>Lb. casei</i> B80	Rammelsberg <i>et al.</i> (1990)
Enterolisina	<i>E. faecalis</i> LMG2333	Nilsen <i>et al.</i> (2000)
Las bacteriocinas con las mismas letras entre paréntesis poseen secuencias aminoacídicas idénticas.		
<sup>*</sup> Bacteriocinas que pueden ser incluidas también en la clase IIa. <sup>§</sup> Bacteriocinas que se asemejan a los sistemas de dos péptidos (clase IIb). Las abreviaturas de los géneros bacterianos aparecen en el Apéndice 1.		

Fuentes: Casaus (1998) y Cintas *et al.* (2000c)

- 2) Clase II: comprende bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 KDa), termoestables, que no contienen aminoácidos modificados y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática. Las bacteriocinas de la clase II se dividen, a su vez, en los siguientes grupos (Moll *et al.*, 1999b):
- (i) subclase IIa, o familia de la pediocina, integrada por bacteriocinas con una potente actividad antilisteria y un alto grado de homología (40-60%) en sus secuencias aminoacídicas, especialmente en la región N-terminal, donde aparece la secuencia aminoacídica consenso YGNGVXC (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Aymerich *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000).
  - (ii) subclase IIb, que comprende aquellas bacteriocinas que requieren la combinación de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.
  - (iii) subclase IIc, compuesta por bacteriocinas secretadas mediante la Ruta General de Secreción (GSP, del inglés *General Secretory Pathway*) o ruta *sec* (para una revisión ver Pugsley, 1993 y Fekkes y Driessen, 1999).
  - (iv) subclase IId, engloba a aquellos péptidos de la clase II no incluidos en ninguno de los grupos anteriores.
- 3) Clase III: constituida por bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles (se inactivan con tratamientos térmicos a 60-100°C durante 10-15 min). La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por especies del género *Lactobacillus*.

Klaenhammer (1993) propuso la existencia de una cuarta clase, compuesta por bacteriocinas complejas, integradas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas necesarias para su actividad biológica. No obstante, antes de reconocer a estas bacteriocinas como una clase diferente debe completarse su caracterización bioquímica.

## II.2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas contienen un componente proteico cuya destrucción elimina por completo la actividad antimicrobiana de estas moléculas (Tagg *et al.*, 1976). En este sentido, las bacteriocinas de las bacterias lácticas se inactivan por la acción de enzimas proteolíticos, incluyendo los de origen pancreático (tripsina y quimotripsina) y gástrico (pepsina). Esta propiedad es interesante desde el punto de vista de la seguridad de estos compuestos, ya que, si las bacteriocinas se emplearan como bioconservantes en la industria alimentaria, la ecología del tracto digestivo de los consumidores no resultaría afectada (Piard y Desmazeaud, 1992).

Los lantibióticos (clase I) constituyen una clase especial de bacteriocinas policíclicas producidas, aparentemente de manera exclusiva, por bacterias Gram-positivas y caracterizadas por la presencia de aminoácidos modificados postraduccionamente (Dha, Dhb, Lan y MeLan). Por otra parte, las bacteriocinas de las clases II y III carecen de modificaciones postraduccionales, con la excepción de la formación de una estructura cíclica en la enterocina AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1994) y del establecimiento de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína (Casaus, 1998; Eijsink *et al.*, 1998). En función de su contenido en cisteína, Klaenhammer (1993) clasificó a estas bacteriocinas en los siguientes grupos: (i) cistibióticos, bacteriocinas con uno o más puentes disulfuro, como la pediocina PA-1/AcH y la enterocina A, con dos puentes disulfuro entre los residuos 9-14 y 24-44 (Henderson *et al.*, 1992; Motlagh *et al.*, 1992; Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1997a; Eijsink *et al.*, 1998), y 9-14 y 24-42 (Eijsink *et al.*, 1998), respectivamente, la leucocina A y la sakacina P, ambas con un único puente disulfuro entre las posiciones 9 y 14 (Hastings *et al.*, 1991), la curvacina A/sakacina A, con un único puente disulfuro entre los residuos 10-15, y, quizás, la mesentericina Y105, la lactacina F, las carnobacteriocinas A y BM1 (Jack *et al.*, 1995) y la enterocina P (Casaus, 1998); (ii) tiolbóticos, con un único residuo de cisteína, como la lactococcina B (Venema *et al.*, 1993; 1996); y (iii) bacteriocinas que carecen de residuos de cisteína, como las lactococcinas A, M y G (Van Belkum *et al.*, 1991a; Nissen-Meyer *et al.*, 1992a).

Con respecto al tamaño molecular, los lantibióticos son péptidos pequeños (1.959 a 4.635 Da), las bacteriocinas de la clase II poseen una masa molecular inferior a 10 kDa, y las de la clase III presentan una masa molecular considerablemente superior al de las anteriores (>30 kDa). La mayoría de las bacteriocinas de bajo peso molecular (clases I y II) son catiónicas a pH 7,0 (Jack *et al.*, 1995), poseen un elevado punto isoeléctrico (pI) y contienen regiones hidrofóbicas y/o hidrofílicas en sus moléculas, lo que se correlaciona con su actividad sobre la membrana citoplasmática (Nes *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1999a). Estas bacteriocinas son generalmente activas a pH ácido y neutro, lo que podría reflejar su adaptación a las condiciones ambientales en las que se desarrollan los microorganismos productores (Piard y Desmazeaud, 1992; Cintas, 1995). En general, estas bacteriocinas resisten la exposición a un amplio intervalo de valores de pH (3,0- 9,0) (Cintas, 1995), habiéndose observado tolerancia a valores de pH más extremos (entre 1,0-2,0 y 10,0-11,0) en las bacteriocinas acidocina B (ten Brink *et al.*, 1994) y bavaricina A (Larsen *et al.*, 1993). Por el contrario, existen bacteriocinas que presentan un intervalo de pH óptimo para su actividad muy estrecho; así, por ejemplo, la solubilidad de la nisina disminuye considerablemente en el intervalo de pH 2,0-6,0 y la bacteriocina se inactiva irreversiblemente a pH 7,0 (Hurst, 1981).

Otra característica común de las bacteriocinas de las bacterias lácticas es su termoestabilidad, que depende de factores como el grado de pureza de la bacteriocina o el pH del medio (Cintas *et al.*, 2000c). En este contexto, las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes libres de células (bacteriocinas no purificadas) resisten el calentamiento a 100-121°C y el autoclavado, a excepción de las bacteriocinas de la clase III caseicina 80 (Rammelsberg *et al.*, 1990) y helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), y de la bacteriocina de la clase II enterocina 01 (Olasupo *et al.*, 1994). La estabilidad térmica de las bacteriocinas parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad disminuye considerablemente, como se ha demostrado en el caso de la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984), carnocina U-149 (Stoffels *et al.*, 1992) y sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1992). Por el contrario, la nisina purificada permanece activa tras su calentamiento a 100°C durante 10 min a pH 2,0 (Hurst, 1981).

### II.2.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA

De acuerdo con la definición de las bacteriocinas propuesta por Tagg *et al.* (1976), estos péptidos ejercen su actividad antimicrobiana exclusivamente frente a bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora; sin embargo, esta definición se basaba en las colicinas de *E. coli*, y, en la actualidad se conocen numerosos ejemplos de bacteriocinas, especialmente de bacterias lácticas, que poseen un amplio espectro de acción (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995). En general, pueden realizarse las siguientes observaciones con respecto a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (clases I y II) (Jack *et al.*, 1995): (i) dentro de una misma especie pueden existir cepas sensibles o resistentes a una bacteriocina determinada; (ii) dentro de una población de células sensibles a una bacteriocina pueden existir ciertas células resistentes; (iii) una cepa sensible a una bacteriocina puede ser resistente a otra bacteriocina similar; (iv) los esporos bacterianos resistentes a una bacteriocina procedentes de células vegetativas sensibles a dicha bacteriocina se hacen sensibles a ésta tras la germinación; y (v) en condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas no son activas frente a las bacterias Gram-negativas, a excepción de la enterocina AS-48, que es activa frente a *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, entre otras bacterias Gram-negativas (Gálvez *et al.*, 1989). No obstante, las bacterias Gram-negativas pueden resultar inhibidas por las bacteriocinas de las bacterias lácticas si se altera la integridad de su pared celular mediante el tratamiento con agentes químicos (por ejemplo, ácidos orgánicos, EDTA y otros agentes quelantes) o bajo condiciones ambientales estresantes (por ejemplo, pH, congelación, calentamiento moderado o presión hidrostática alta)

(Stevens *et al.*, 1991; Kalchayanand *et al.*, 1998; Audisio *et al.*, 1999; Garriga *et al.*, 1999).

La heterogeneidad del espectro de acción antimicrobiana de las bacteriocinas de las bacterias lácticas permite el establecimiento de tres grupos: (i) bacteriocinas con un espectro antimicrobiano estrecho, únicamente activas frente a cepas de la misma especie que la productora, como la caseicina 80 (Rammelsberg *et al.*, 1990) y la lactococcina A (Holo *et al.*, 1991), o frente a especies del mismo género, como la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1983), la lactocina 27 (Upreti, 1994) y la amilovorina L471 (De Vuyst *et al.*, 1996); (ii) bacteriocinas con un espectro antimicrobiano intermedio, que inhiben a otros géneros de bacterias lácticas distintos al del microorganismo productor y a otras bacterias Gram-positivas, incluyendo *Ls. monocytogenes*, *St. aureus*, *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum*. Este grupo incluye, por ejemplo, la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1987), la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1990), las plantaricinas S y T (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993) y la plantaricina C (González *et al.*, 1994); y (iii) bacteriocinas con un amplio espectro, que, además de las especies mencionadas anteriormente, inhiben a *Propionibacterium* spp. y *Bacillus* spp. Dentro de este grupo se incluyen la nisina A y Z, que inhiben también la germinación de esporos de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp (Hurst, 1981; Harris *et al.*, 1992; Vandenberg, 1993), la pediocina PA-1 (Bhunja *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 1992), la leucocina S (Lewus *et al.*, 1991) y las enterocinas L50 (Cintas *et al.*, 1995; 1998b).

Dado que el trabajo experimental de esta tesis doctoral se centra en bacteriocinas producidas por cepas de *E. faecium*, en la Tabla II.4 se muestra el espectro de acción conocido de las enterocinas descritas hasta la fecha.

#### II.2.4. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS

En general, los determinantes genéticos de los operones asociados a la síntesis de bacteriocinas se encuentran agrupados en uno o dos operones y constan de: (i) un gen estructural, que codifica la preprobacteriocina; (ii) un gen que codifica la proteína de inmunidad; (iii) los genes responsables del procesamiento y transporte de la preprobacteriocina; y, en ocasiones, (iv) los genes que codifican enzimas encargados de las modificaciones postraduccionales de la probacteriocina (Nes *et al.*, 1996; Nissen Meyer y Nes, 1997; Skaugen *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2000c). En el caso de las bacteriocinas cuya síntesis está regulada mediante un sistema de transducción de señales de tres componentes (sección II.2.4.4), se encuentran además los siguientes genes: (i) un gen que codifica el precursor de la feromona o factor de inducción (IF, del inglés *Induction Factor*); (ii) el



Tabla II.4. Espectro de acción de enterocinas producidas por diversas cepas de *E. faecium*

Bacteriocina	Cepa productora	Espectro de acción	Referencias
Enterocina E1A	<i>E. faecium</i> E1A	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. innocua</i> <i>Ls. monocytogenes</i>	Krämer y Brandis (1975)
Enterocina E1B	<i>E. faecium</i> E1B	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. innocua</i> <i>Ls. monocytogenes</i>	Krämer y Brandis (1975)
Enterococcina Sf3	<i>E. faecium</i> 3	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. monocytogenes</i> <i>Cl. butyricum</i>	Krämer <i>et al.</i> (1983)
Bacteriocinas (2)	<i>E. faecium</i> NCIB2699 <i>E. faecium</i> NCIB2702	<i>Listeria</i> spp.	McKay (1990)
Enterocina 1146 <sup>1</sup>	<i>E. faecium</i> DPC1146	<i>E. faecalis</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>L. lactis</i> <i>Cl. perfringens</i> <i>Cl. tyrobutyricum</i> <i>Ls. monocytogenes</i>	Parente y Hill (1992a,b) O'Keeffe <i>et al.</i> (1999)
Bacteriocinas (3)	<i>E. faecium</i> JBL1061 <i>E. faecium</i> JBL1083 <i>E. faecium</i> JBL1351	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Lb. sakei</i> <i>L. cremoris</i> <i>Ls. monocytogenes</i>	Arihara <i>et al.</i> (1993)
Enterocina CCM4231	<i>E. faecium</i> CCM4231	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp <i>Cl. perfringens</i> <i>Ls. monocytogenes</i>	Lauková <i>et al.</i> (1993) Lauková <i>et al.</i> (1998) Lauková <i>et al.</i> (1999)
Enterocina 100	<i>E. faecium</i> 100	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp <i>Lactobacillus</i> spp., <i>L. lactis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>St. aureus</i> <i>Ls. monocytogenes</i>	Kato <i>et al.</i> (1993)

Tabla II.4 (cont.)			
Bacteriocina	Cepa productora	Espectro de acción	Referencias
Enterocina 01	<i>E. faecium</i> NA01	<i>E. faecalis</i> <i>Lactobacillus</i> spp., <i>L. lactis</i>	Olasupo <i>et al.</i> (1994)
Bacteriocinas (14)	<i>E. faecium</i>	<i>Lb. plantarum</i> <i>L. lactis</i> <i>B. thermosphacta</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>Ls. monocytogenes</i>	Ben Embarek <i>et al.</i> (1994)
Bacteriocina	<i>E. faecium</i> 7C5	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Listeria</i> spp. <i>St. aureus</i> , <i>Cl. tyrobutyricum</i>	Torri Tarelli <i>et al.</i> (1994) Giraffa <i>et al.</i> (1995)
Bacteriocinas (2)	<i>E. faecium</i> RZSC5 <i>E. faecium</i> RZSC13	<i>Listeria</i> spp. <i>Lc. mesenteroides</i>	Vlaemynck <i>et al.</i> (1994)
Enterocina EL1	<i>E. faecium</i> L1	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Listeria</i> spp.	Lyon <i>et al.</i> (1995)
Enterocinas L50 (L50A y L50B)	<i>E. faecium</i> L50	Bacterias Gram-positivas	Cintas (1995) Cintas <i>et al.</i> (1995) Cintas <i>et al.</i> (1998b)
BLIS Ef 108	<i>E. faecium</i> 108	<i>Listeria</i> spp.	Dallas <i>et al.</i> (1996)
Enterocina CRL35	<i>E. faecium</i> CRL35	<i>Listeria</i> spp. <i>St. aureus</i>	Farías <i>et al.</i> (1994) Farías <i>et al.</i> (1996) Wachsman <i>et al.</i> (2000)
Enterocina A	<i>E. faecium</i> CTC 492 <i>E. faecium</i> T136	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. <i>E. faecalis</i> <i>Listeria</i> spp. <i>Clostridium</i> spp.	Aymerich (1996) Aymerich <i>et al.</i> (1996) Casaus <i>et al.</i> (1997) Casaus (1998)

Tabla II.4 (cont.)

Bacteriocina	Cepa productora	Espectro de acción	Referencias
Enterocina 900 <sup>2</sup>	<i>E. faecium</i> BFE900	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Lb. sakei</i> <i>Listeria</i> spp.	Franz <i>et al.</i> (1996)
Enterocina B	<i>E. faecium</i> T136 <i>E. faecium</i> CTC492	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>Ls. monocytogenes</i> <i>St. aureus</i> <i>Clostridium</i> spp.	Casaus <i>et al.</i> (1997) Casaus (1998) Nilsen <i>et al.</i> (1998)
Enterocina P	<i>E. faecium</i> P13 <i>E. faecium</i> L50	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> <i>Propionibacterium</i> sp. <i>Listeria</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	Cintas <i>et al.</i> (1997) Casaus (1998) Cintas <i>et al.</i> (2000b)
Enterocina 81	<i>E. faecium</i> WHE81	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. monocytogenes</i>	Ennahar <i>et al.</i> (1998)
Enterocina I <sup>3</sup>	<i>E. faecium</i> 6T1a	Bacterias Gram-positivas	Floriano <i>et al.</i> (1998)
Enterocina	<i>E. faecium</i> J96	<i>Salmonella</i> spp.	Audisio <i>et al.</i> (1999)
Enterocina ON-157	<i>E. faecium</i> NIAI 157	<i>Lb. sakei</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Ls. monocytogenes</i>	Ohmomo <i>et al.</i> (2000)
Enterocina Q	<i>E. faecium</i> L50	ND*	Cintas <i>et al.</i> (2000b)
<p><sup>1</sup> O'Keeffe <i>et al.</i> (1999) han confirmado la identidad de la enterocina 1146 con la enterocina A producida por <i>E. faecium</i> CTC492 (Aymerich <i>et al.</i>, 1996) y <i>E. faecium</i> T136 (Casaus <i>et al.</i>, 1997; Casaus, 1998).<sup>2</sup> Franz <i>et al.</i>, 1999 han confirmado recientemente la identidad de la enterocina 900 con la enterocina B de <i>E. faecium</i> T136 (Casaus <i>et al.</i>, 1997) y de <i>E. faecium</i> CTC492 (Nilsen <i>et al.</i>, 1998).<sup>3</sup> Floriano <i>et al.</i> (1998) han señalado la identidad de la enterocina I con la enterocina L50A descrita por Cintas <i>et al.</i> (1998b). * No determinado. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> aparece abreviado como <i>L. lactis</i> y <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> como <i>L. cremoris</i>. Las abreviaturas de los géneros bacterianos se muestran en el Apéndice 1.</p>			

gen de la proteína sensora histidín-quinasa (HPK, del inglés *Histidine Protein Kinase*); y (iii) el gen que codifica la proteína reguladora de respuesta (RR) (Nes *et al.*, 1996).

En la Fig. 2.1 se muestra una representación esquemática de la organización de los determinantes genéticos de diversas enterocinas producidas por *E. faecium*.

Por otra parte, como se indica en la Tabla II.5, los genes implicados en la síntesis de bacteriocinas pueden localizarse en el cromosoma bacteriano (generalmente integrados en un transposón compuesto) o en plásmidos (Jack *et al.*, 1995). La carnobacteriocina BM1 constituye un caso especial, pues, a pesar de que el gen estructural y el de la inmunidad se localizan en el cromosoma, la síntesis de la bacteriocina y la inmunidad a la misma dependen de la presencia de un plásmido de 61 kb (Quadri *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1997; Saucier *et al.*, 1997). Los genes implicados en la síntesis de diferentes bacteriocinas por una misma cepa pueden encontrarse en el mismo plásmido, como en el caso de las lactococinas A, B y M de *L. lactis* (Van Belkum *et al.*, 1991a; Morgan *et al.*, 1995), en plásmidos diferentes, como en las carnobacteriocinas A y B2 de *Cb. piscicola* LV17, o en el cromosoma y en el plásmido, como la carnobacteriocina BM1 (codificada en el cromosoma) y las carnobacteriocinas A y B2 (Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1994; 1995; 1997).

#### II.2.4.1. Gen estructural

La mayoría de los genes estructurales de las bacteriocinas de las bacterias lácticas codifican precursores inactivos o preprobacteriocinas, con un dominio C-terminal (probacteriocina, o, en su caso, bacteriocina madura) y una extensión N-terminal (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). Las extensiones N-terminales (bien del tipo secuencia líder doble glicina, o bien péptidos señales) desempeñan un papel fundamental en el procesamiento (eliminación de la extensión N-terminal) y transporte al medio exocelular de las bacteriocinas (ver sección II.4). Además, las secuencias líder podrían intervenir en la modificación postraducciona de ciertos lantibióticos (Skaugen *et al.*, 2000) y en la protección de la célula productora frente a la toxicidad de las bacteriocinas mientras éstas permanecen en su interior (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996). En la actualidad, las únicas bacteriocinas de las bacterias lácticas sintetizadas sin ningún tipo de extensión N-terminal son las enterocinas L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998b) y la enterocina Q (Cintas *et al.*, 2000b). Algunas probacteriocinas sufren modificaciones postraduccionales, como el establecimiento de anillos tioéter en los lantibióticos o de puentes disulfuro en las bacteriocinas de la familia de la pediocina,

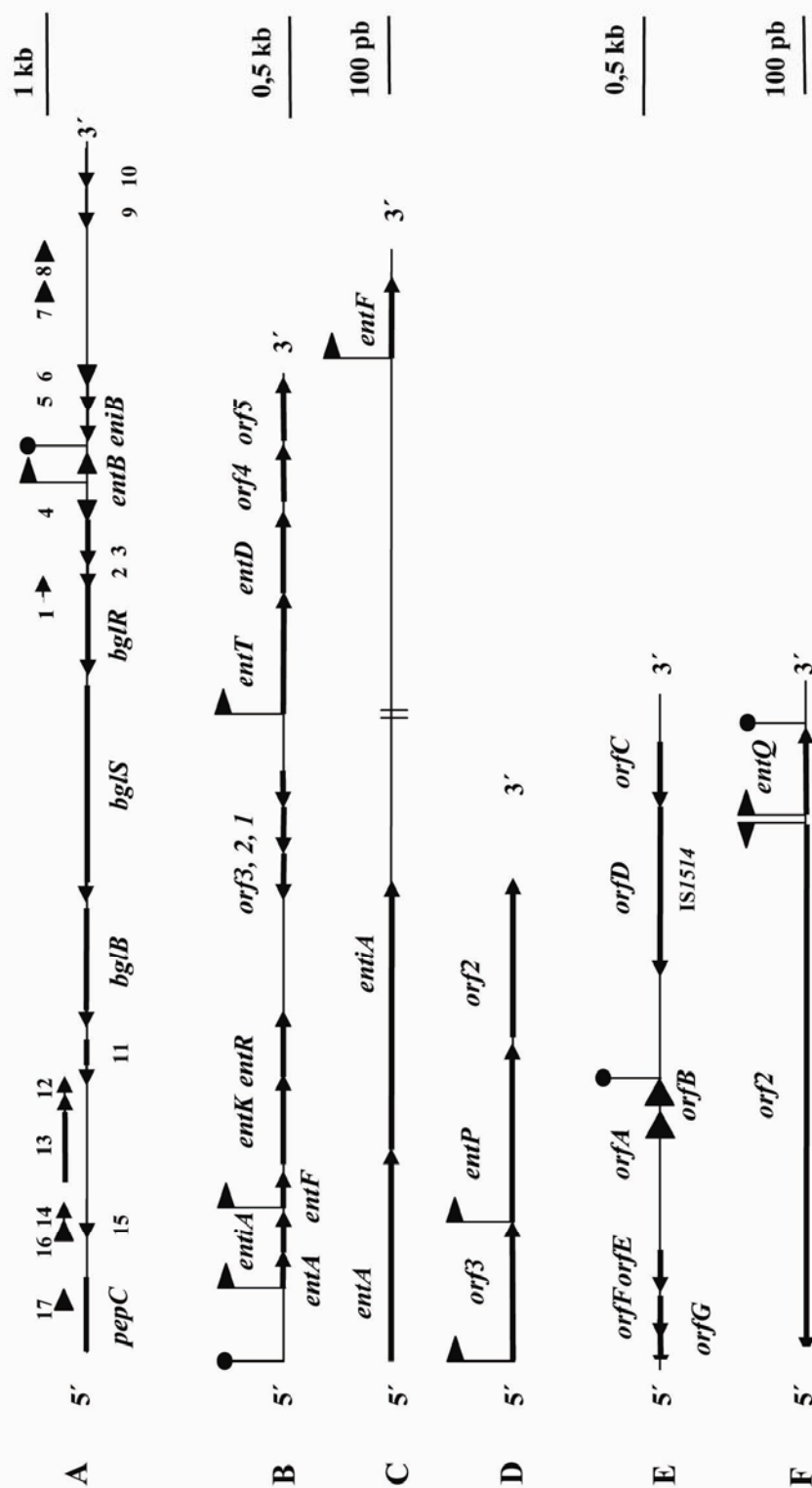


Fig. 2.1. Representación esquemática de los operones de: (A) enterocina B de *E. faecium* BFE900 (Franz *et al.*, 1999); (B) enterocina A de *E. faecium* DPC1146 (O'Keeffe *et al.*, 1999); (C) enterocina A de *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996; Nilsen *et al.*, 1998); (D) enterocina P de *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998; Cintas 2000b); (E) enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998b); y (F) enterocina Q de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 2000b). Los promotores de la transcripción y los terminadores de la transcripción *rho*-independientes se representan con los símbolos y , respectivamente.

**Tabla II.5. Localización de los determinantes genéticos de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas**

**Localización cromosómica**

**Lantibióticos**

- Nisina A y Z (Horn *et al.*, 1991; Mulders *et al.*, 1991)
- Salivaricina A (Simpson y Tagg, 1986)
- Estreptococcina FF22 (Simpson y Tagg, 1986)
- Carnocina UI149 (Nes y Tagg, 1996)

**No lantibióticos**

- Sakacina P (Hühne *et al.*, 1996; Holck *et al.*, 1994a)
- Enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996)
- Bacteriocinas de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996)
- Lactococina G (Håvarstein *et al.*, 1993)
- Lactacina F (Frémaux *et al.*, 1993)
- Carnobacteriocina BM1 (Quadri *et al.*, 1994, 1995, 1997; Saucier *et al.*, 1997)

**Localización plasmídica**

**Lantibióticos**

- Lacticina 481 (Piard *et al.*, 1992)
- Lactocina S (Mørtvedt y Nes, 1991)

**No lantibióticos**

- Pediocina PA-1/AcH (Venema *et al.*, 1995)
- Leucocina A (Van Belkum y Stiles, 1995)
- Mesentericina Y105 (Frémaux *et al.*, 1995)
- Lactococcinas A, B y M (Holo *et al.*, 1991; Van Belkum *et al.*, 1991a; Stoddard *et al.*, 1992)
- Sakacina A/curvacina A (Axelsson y Holck, 1995)
- Acidocina A (Kanatani *et al.*, 1995)
- Carnobacteriocinas A y B2 (Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1994, 1995)
- Acidocin B (Leer *et al.*, 1995)
- Divergicin A (Worobo *et al.*, 1995)
- Enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1998b)
- Bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996)
- Enterocina Q (Cintas *et al.*, 2000b)

Fuente: Cintas *et al.* (2000c)

que dan lugar al péptido maduro (bacteriocina activa biológicamente). A este respecto, se ha sugerido que las modificaciones tendrían lugar en el exterior de la célula, puesto que la presencia de estas estructuras cíclicas podría dificultar su translocación al medio exocelular (Jack *et al.*, 1995). La deshidratación de los aminoácidos serina y treonina origina  $\alpha,\beta$ -Dha y  $\alpha,\beta$ -Dhb, respectivamente, y la condensación de Dha o Dhb con residuos de cisteína mediante anillos tioéter origina los aminoácidos Lan y MeLan, respectivamente, lo que confiere a estas moléculas una estructura policíclica debido al establecimiento de puentes intracatenarios. Contrariamente a la formación de aminoácidos modificados en los lantibióticos, que requiere la participación de enzimas específicas, el establecimiento de puentes disulfuro en las bacteriocinas de tipo no-lantibiótico es un proceso espontáneo (Casaus, 1998).

#### II.2.4.2. Gen de inmunidad

Los determinantes genéticos asociados a la producción de bacteriocinas de la clase II, es decir, el gen estructural, el gen de inmunidad y los genes que codifican el sistema de transporte dedicado del tipo ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*) (sección II.4.1) suelen estar organizados en uno o dos operones. El gen de inmunidad se sitúa generalmente en el mismo operón que el estructural y posee la misma orientación que éste. La proteína de inmunidad específica se expresa concomitantemente con la bacteriocina, pero, a diferencia de ésta, no requiere el sistema de procesamiento y transporte (Nes *et al.*, 1996). Sin embargo, a diferencia de esta organización genética, la carnobacteriocina A (Worobo *et al.*, 1994), la acidocina B (Leer *et al.*, 1995), la enterocina B (Casaus *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999) y la enterocina Q (Cintas *et al.*, 2000c), poseen un terminador de la transcripción del tipo *rho*-independiente inmediatamente detrás del gen estructural de la bacteriocina. Asimismo, la secuenciación de un fragmento de 3,5 kb del plásmido pCIZ1 de *E. faecium* L50 que contiene los genes estructurales de las enterocinas L50A y L50B ha revelado la ausencia de genes que codifiquen para las proteínas de inmunidad y transporte, por lo que en la actualidad se desconoce cómo se protege la cepa productora del efecto tóxico de estas bacteriocinas y el mecanismo de secreción de las mismas (Cintas *et al.*, 1998b).

Las proteínas de inmunidad se caracterizan por su pequeño tamaño (entre 51 y 154 aminoácidos), por su elevado pI (entre 7 y 10) y por la presencia de segmentos transmembrana (TMS, del inglés *Transmembrane Segments*), lo que sugiere que podrían integrarse en las membranas citoplasmáticas de las células productoras de bacteriocinas para ejercer su acción (Frémaux *et al.*, 1993; Diep *et al.*, 1996). Aunque se han propuesto varios modelos para explicarlo,

el mecanismo molecular de acción de la inmunidad del microorganismo productor no se conoce con precisión. Abee (1995) sugirió que las proteínas de inmunidad podrían interaccionar con las bacteriocinas en el medio exocelular, lo que impediría su interacción con las membranas citoplasmáticas y, por lo tanto, la formación de poros; sin embargo, la evidencia experimental obtenida con las proteínas de inmunidad de la lactococcina A (LciA) (Venema *et al.*, 1994; Venema, 1995) y de la carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1995) condujeron a descartar esta hipótesis, puesto que estas proteínas no eran activas desde el exterior celular. De acuerdo con el modelo propuesto por Venema *et al.* (1994), LciA podría presentar una hélice  $\alpha$  hidrofóbica entre los residuos 29 y 47 que podría interaccionar con una proteína transmembrana, presumiblemente el hipotético receptor de la lactococcina A, orientando sus extremos N y C-terminal hacia el citosol y el exterior celular, respectivamente. La interacción de LciA con el receptor proteico de la bacteriocina dificultaría la inserción de ésta en la membrana y, por lo tanto, su acción antimicrobiana.

El modelo propuesto por Abee (1995) sugiere que la proteína de inmunidad interaccionaría con las moléculas de bacteriocina integrantes de los poros de membrana, desestabilizándolos y/o sellándolos. Sin embargo, debido a la escasa similitud que existe entre las proteínas de inmunidad de bacteriocinas estrechamente relacionadas (Aymerich *et al.*, 1996), resulta poco probable que se produzca una interacción directa entre la bacteriocina y su proteína de inmunidad (Nes *et al.*, 1996).

#### **II.2.4.3. Genes de procesamiento y transporte**

El transporte y procesamiento de las bacteriocinas que se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder doble glicina depende de la coexpresión de dos genes que codifican un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, y que, generalmente, se encuentran ligados al gen estructural y al de inmunidad (Nes *et al.*, 1996). Las características de este sistema de transporte, así como las de la ruta GSP, se tratan detalladamente en la sección II.4 de esta memoria.

#### **II.2.4.4. Genes implicados en la regulación de la biosíntesis**

Los genes que participan en la regulación de la biosíntesis de bacteriocinas pueden encontrarse en un operón independiente, como en el caso de las plantaricinas EF y JK (Diep *et al.*, 1996), o bien, formar parte del operón en el que se localizan los genes de transporte, como se ha descrito



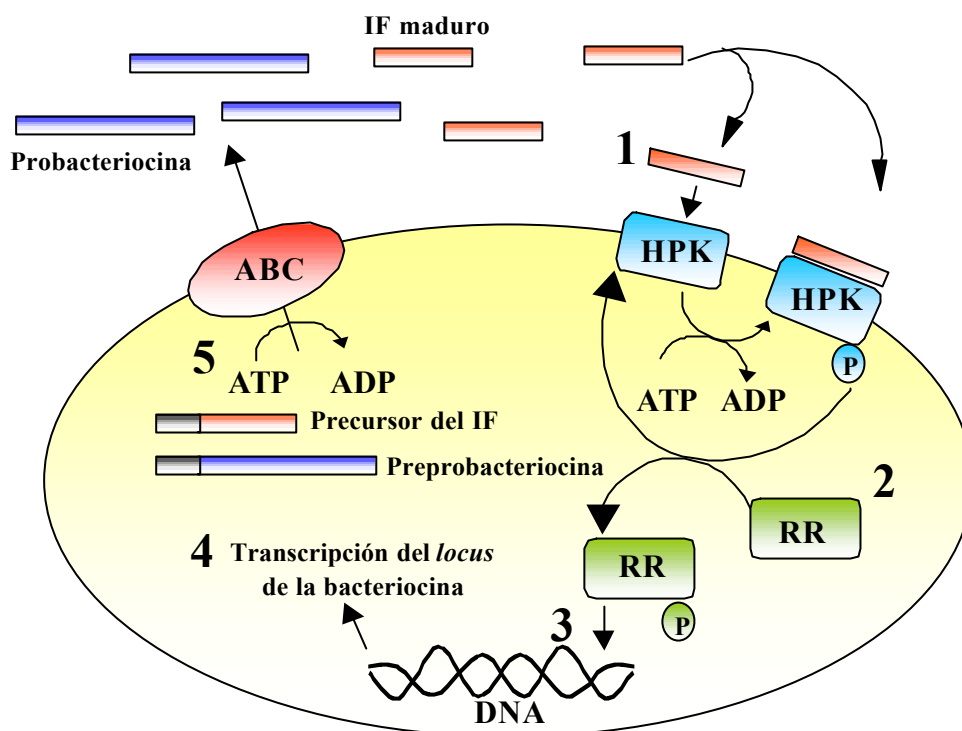
para la carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1997). En lo que se refiere a su localización, el gen que codifica la feromona o IF se sitúa generalmente delante de los genes que codifican la HPK y la proteína RR. Diep *et al.* (1996) identificaron secuencias repetidas directas de 9-10 pb, localizadas inmediatamente delante de las regiones promotoras y separadas entre sí por 12-13 nucleótidos, que constituyen los sitios de unión de los reguladores de la síntesis de bacteriocinas a nivel transcripcional. Estas secuencias, denominadas “cajas reguladoras”, están conservadas en muchas bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, lo que sugiere que sus promotores están bajo el control del mismo mecanismo de regulación (Nes *et al.*, 1996).

En numerosas ocasiones, la capacidad de producir bacteriocinas desaparece en determinadas cepas debido a la inestabilidad plasmídica, a la inactivación de los determinantes genéticos por la inserción de transposones, o bien, a la dilución de los cultivos productores en medio líquido por debajo de un determinado nivel umbral (Klaenhammer *et al.*, 1993; Eijsink *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 2000c). La existencia de mecanismos de regulación de la producción de bacteriocinas se ha observado para la nisina (Kuipers *et al.*, 1995), sakacina A de *Lb. sakei* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995), sakacina P de *Lb. sakei* LTH673 (Eijsink *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997), carnobacteriocinas A, B2 y BM1 de *Cb. piscicola* LV17 y LV17B (Quadri *et al.*, 1997; Saucier *et al.*, 1997), plantaricinas EF, JK y N de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998) y enterocina A de *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998).

#### II.2.4.4.1. Características generales de los sistemas de regulación de la biosíntesis

La regulación de la producción de algunas bacteriocinas de la clase II depende de un sistema de transducción de señales de tres componentes semejante al que interviene en las respuestas de las células bacterianas a modificaciones ambientales como, por ejemplo, el desarrollo de la competencia celular o de la virulencia (Diep *et al.*, 1996; Morfeldt *et al.*, 1996). Este sistema consta de una molécula señal o feromona (IF), de una proteína histidín-quinasa (HPK) y de una proteína reguladora de respuesta (RR) (Nes *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997) (Fig. 2.2).

La HPK contiene un dominio N-terminal, con una función sensora, localizado en el lado periplásmico de la membrana y un dominio C-terminal, o transmisor, localizado en el lado citosólico, ambos unidos generalmente por un dominio de membrana con 2-6 TMS. El dominio C-terminal posee actividad autoquinasa y contiene un residuo de histidina absolutamente conservado que constituye el sitio de fosforilación. Asimismo, el RR posee un dominio N-terminal, con un residuo de ácido aspártico conservado que representa el lugar de fosforilación, y un dominio receptor o C-terminal, que media la respuesta adaptativa (Nes *et al.*, 1996).



**Figura 2.2. Representación esquemática de un sistema de transducción de señales de tres componentes.** El mecanismo de inducción de la síntesis de bacteriocinas puede dividirse en las siguientes etapas: (1) Interacción del IF con la HPK e inducción de la fosforilación de esta proteína a expensas del ATP; (2) Transferencia del fosfato desde HPK a RR; (3) Activación de los promotores de la transcripción por acción del RR fosforilado; (4) Transcripción de los genes de la prebacteriocina y de otros genes asociados; y (5) Procesamiento y secreción de la prebacteriocina y del IF a través de un transportador ABC. Esquema adaptado de Nes *et al.* (1996) y Skaugen *et al.* (2000).

El mecanismo de inducción consiste en reacciones de fosforilación y desfosforilación acopladas. Así, la desfosforilación de la HPK y la fosforilación acoplada del dominio receptor del RR produce cambios intramoleculares de dicho dominio que posibilitan su interacción con los genes diana y la regulación de su transcripción. El mecanismo de regulación de la transcripción podría consistir en la unión del RR a secuencias específicas del DNA próximas al promotor, lo que estimularía o inhibiría la unión de la RNA polimerasa a su promotor, y, por tanto, la síntesis de las bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997).

#### II.2.4.4.2. *La feromona o factor de inducción*

El factor de inducción constituye la señal inicial del sistema regulador de tres componentes que controla la biosíntesis de determinadas bacteriocinas. El IF es un péptido pequeño, que puede

presentar modificaciones postraduccionales, y que se secreta por un transportador específico del tipo ABC (Nes y Eijsink, 1999). En los últimos años se ha purificado un número considerable de IFs, entre los que se encuentran el de *Lb. plantarum* C11 (productor de las plantaricinas EF, JK y N) (Diep *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998), *Lb. sakei* LTH673 (productor de sakacina P) (Eijsink *et al.*, 1996), *Cb. piscicola* LV17 (productor de las carnobacteriocinas A, B2 y BM1) (Quadri *et al.*, 1997; Saucier *et al.*, 1997) y *E. faecium* CTC492 (productor de las enterocinas A y B) (Nilsen *et al.*, 1998). Los IFs son péptidos de pequeño tamaño molecular, con un número de aminoácidos comprendido entre 19 y 26, catiónicos y con la capacidad de formar una hélice  $\alpha$  anfifílica. Además, algunos se sintetizan en forma de precursores con una secuencia líder del tipo doble glicina, lo que sugiere que su secreción tiene lugar por el mismo mecanismo que el de las bacteriocinas que contienen este tipo de extensión N-terminal (sección II.4.1) (Diep *et al.*, 1996; Eijsink *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Kleerebezem *et al.*, 1997; Quadri *et al.*, 1997). A pesar de su semejanza con las bacteriocinas, los IFs carecen de actividad antimicrobiana, excepto la plantaricina A (Anderssen *et al.*, 1998) y la nisina, que induce su propia síntesis (Kuipers *et al.*, 1995). Además, la actividad biológica de los IFs precisa una concentración considerablemente menor que la requerida por las bacteriocinas para ejercer su efecto antimicrobiano (Nes y Eijsink, 1999).

En la actualidad existen dos modelos para explicar el proceso de inducción de la síntesis de bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996). Según el modelo de regulación por la densidad celular (del inglés *Quorum Sensing*), el IF se produce constitutivamente y se acumula progresivamente durante el crecimiento celular; cuando el IF alcanza el nivel umbral requerido para ejercer la autoinducción, se incrementa la expresión de los genes de la bacteriocina. El modelo alternativo propone que el IF se produce a un nivel ligeramente inferior al necesario para la autoinducción; la presencia de ciertas condiciones ambientales aumenta transitoriamente la producción de IF, que, una vez superado su nivel umbral, puede inducir su propia síntesis y, finalmente, la de la bacteriocina.

### II.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS

La fermentación, una de las técnicas de conservación de los alimentos más antiguas que se conocen, se emplea con el fin de conservar o mejorar las cualidades organolépticas y la seguridad microbiológica de los alimentos. Tradicionalmente, la flora presente naturalmente en los alimentos ha sido la responsable de su fermentación; sin embargo, en la actualidad, la industria alimentaria prefiere el empleo de cultivos iniciadores, que permiten asegurar y estandarizar la calidad del producto final. Entre los microorganismos empleados como iniciadores, concretamente en embutidos crudos curados, se encuentran levaduras, hongos, micrococáceas y bacterias lácticas (Cintas y Casaus 1998d). Las actividades metabólicas de las bacterias lácticas, fundamentalmente la producción de ácido láctico, originan unos productos finales con unas características organolépticas deseables. Además de su función tecnológica, las bacterias lácticas contribuyen a la conservación de los alimentos (sección II.1.2). Sin embargo, la actividad de las bacteriocinas suele ser menos efectiva en los sustratos alimentarios que en los medios de cultivo empleados en el laboratorio (Krier *et al.*, 1998; Aymerich *et al.*, 2000b), ya sea por su inactivación parcial por proteasas, su difusión limitada en la matriz del alimento o su unión inespecífica a ciertos ingredientes del alimento, entre otros factores (Nettles y Barefoot, 1993; Callewaert *et al.*, 2000).

La aplicación de las bacteriocinas en los alimentos requiere el conocimiento previo de su eficacia en estos sistemas, por lo que es imprescindible realizar una selección cuidadosa de las cepas adaptadas a ciertas condiciones ambientales, como la temperatura y el pH (Leroy y De Vuyst, 1999a). Asimismo, se deben considerar los aspectos económicos derivados de su empleo; en este sentido, una manera de reducir los costes consiste en determinar las condiciones óptimas para la producción y estabilidad de la bacteriocina (para ser empleada como bioconservante), de biomasa (para utilizar los microorganismos productores como cultivos iniciadores para la producción *in situ* de bacteriocina) y/o de ácido láctico (un valioso producto de la fermentación).

La obtención de cantidades adecuadas de bacteriocina facilitaría la realización de estudios físico-químicos acerca de estos compuestos (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995), imprescindibles tanto para el suministro regular de bacteriocinas y su empleo racional en la industria alimentaria (Bárcena *et al.*, 1998; Lejeune *et al.*, 1998), como para el diseño de nuevas moléculas con características mejoradas (Nettles y Barefoot, 1993; Montville y Chen, 1998). Además, la optimización de su producción podría proporcionar la materia prima adecuada para la generación de anticuerpos específicos, un aspecto importante, puesto que el desarrollo y puesta a punto de

métodos inmunoquímicos que facilitasen su detección facilitarían su empleo en los alimentos (Suárez, 1999; Martínez, 1999; Martínez, 2000).

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son, generalmente, metabolitos primarios o asociados al crecimiento (De Vuyst *et al.*, 1993; Parente *et al.*, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996; Krier *et al.*, 1998; Callewaert *et al.*, 1999; Leroy y De Vuyst, 1999a; Aymerich *et al.*, 2000b), por lo que, en principio, puede lograrse una mejora de su producción mediante la optimización de las condiciones de crecimiento del microorganismo productor (Biswas *et al.*, 1991; De Vuyst *et al.*, 1993; Kaiser y Montville, 1993; De Vuyst *et al.*, 1996). En este contexto, se ha observado frecuentemente una prolongación de la fase activa del crecimiento y un aumento de la producción de bacteriocinas cuando los microorganismos productores se desarrollan en medios de composición compleja en un fermentador bajo condiciones de temperatura y pH estrictamente controladas y (Geis *et al.*, 1983; Parente y Hill, 1992c; Parente y Ricciardi, 1994; Loubiere *et al.*, 1997; Lejeune *et al.*, 1998). Aunque la producción de bacteriocinas está asociada al crecimiento, se ha observado que, en ocasiones, ligeras diferencias de crecimiento debidas a modificaciones de las condiciones ambientales como el pH, la temperatura, o la concentración de glucosa del medio, originan variaciones considerables en la producción de bacteriocinas (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; Casaus, 1998; Krier *et al.*, 1998). Por otra parte, las complejas interacciones que tienen lugar entre los múltiples factores que afectan a la producción de las bacteriocinas y/o a su inactivación pueden ser responsables de que las condiciones óptimas para el crecimiento de una cepa bacteriocinogénica difiera de las óptimas para la producción de su(s) bacteriocina(s) (De Vuyst *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Bárcena *et al.*, 1998; Casaus, 1998; Krier *et al.*, 1998; Aasen *et al.*, 2000). En este sentido, se ha observado frecuentemente que el pH óptimo para la producción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas es ligeramente inferior al óptimo para el crecimiento del microorganismo productor (Kaiser y Montville, 1993; Parente *et al.*, 1994; Parente y Ricciardi 1994; Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; Chinachoti *et al.*, 1997; Krier *et al.*, 1998). En la Tabla II.6 puede observarse que el pH óptimo para la producción varía con la bacteriocina producida y, en ocasiones, con la cepa productora.

En los últimos años se ha observado que la regulación de la biosíntesis de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas tiene lugar mediante un sistema de transducción de señales de tres componentes (sección II.2.4.4.1), por lo que las condiciones del medio de cultivo, particularmente el pH, podrían actuar a través de este mecanismo para controlar su producción (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; De Vuyst *et al.*, 1996; Casaus, 1998; Nilsen *et al.*, 1998; Aasen *et al.*, 2000), como sucede con otros fenómenos biológicos (Regassa y Betley, 1992; Olson *et al.*, 1993).

Tabla II.6. Condiciones óptimas para la producción de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas

Bacteriocina	Cepa productora	Condiciones de cultivo	pH óptimo <sup>a</sup>	A Máx <sup>b</sup>	Referencias
Lactacina B	<i>Lb. acidophilus</i> N2	MRS, 37°C	6,0	Est. temprana	Barefoot y Klaenhammer (1984) Barefoot <i>et al.</i> (1994)
Lactacina F	<i>Lb. acidophilus</i> 88	MRS, 37°C	7,0	Est. temprana	Muriana y Klaenhammer (1987)
Pediocina PA-1 (Pediocina AcH)	<i>P. acidilactici</i> H	TGE <sup>c</sup> , 30 y 37°C	3,7	Log. (60%) Est. (40%)	Biswas <i>et al.</i> (1991) Yang y Ray (1994)
	<i>Lb. plantarum</i> WHE92	TGE, 30 y 37°C	4,0-6,0	ND	Ennahar <i>et al.</i> (1996)
Bavaricina MN	<i>Lb. bavaricus</i> MN	APT, 30°C	6,0	Log.	Kaiser y Montville (1993)
Mesentericina 5	<i>Lc. mesenteroides</i> * UL5	MRS, 30°C	5,0	Est. temprana	Daba <i>et al.</i> (1993)
Sakacina A	<i>Lb. sakei</i> Lb706	TGE, 30°C	4,5	ND	Yang y Ray (1994)
Camobacteriocinas BM2 y B1	<i>Cb. piscicola</i> LV17b	APT, 25°C	6,0-6,2	Log.	Quadri <i>et al.</i> (1994)
Acidocina B	<i>Lb. acidophilus</i> M46	MRS, 37°C	5,5	Log. y Est.	ten Brink <i>et al.</i> (1994)
Enterocina 1146 (Enterocina A)	<i>E. faecium</i> DPC1146	GM17 <sup>c</sup> , 37°C	5,5	Log.	Parente y Hill (1992c) Parente y Ricciardi (1994)
Lactococcina 140	<i>L. lactis</i> 140NWC	Semid <sup>d</sup> , 30°C	5,0-5,5	Log. tardía	Parente <i>et al.</i> (1994)

Tabla II.6. (cont.)

Bacteriocina	Cepa productora	Condiciones de cultivo	pH óptimo	AA máx <sup>b</sup>	Referencias
Lactocina S	<i>Lb. sakei</i> L45	MRS, 30°C	5,0	Log. tardía	Mørtvedt-Abildgaard <i>et al.</i> (1995)
Pediocina 5	<i>P. acidilactici</i> UL5	MRS, 30°C	5,0	ND	Huang <i>et al.</i> (1996)
Enterocina A	<i>E. faecium</i> CTC492	MRS, 30°C	6,2	Est. temprana	Nilsen <i>et al.</i> (1998)
Enterocinas A y B	<i>E. faecium</i> T136	MRS, 30°C	5,7	Log.	Casaus (1998)
Enterocinas A y B	<i>E. faecium</i> CTC492	MRS, 30°C	5,5 <sup>e</sup>	Est. Temprana	Aymerich <i>et al.</i> (2000b)
Mesentericinas 52A y 52B	<i>Lc. mesenteroides</i> * FR52	MRS, 30°C	5,5 (52A) 5,0 (52B)	Varios máximos	Krier <i>et al.</i> (1998)
Plantaricina C	<i>Lb. plantarum</i> LL441	MRS, 30°C <sup>f</sup>	5,0	Est.	Bárcena <i>et al.</i> (1998)
Sakacina K	<i>Lb. sakei</i> CTC494	MRS, 20-25°C	5,0	Log.	Leroy y De Vuyst (1999a,b)
Sakacina P	<i>Lb. sakei</i> CCUG 42687	DML-B <sup>g</sup> , 20°C	5,7-6,3	Est. temprana	Mørseth <i>et al.</i> (2000) Aasen <i>et al.</i> (2000)

\* *Lc. mesenteroides* subesp. *mesenteroides* aparece abreviado como *Lc. mesenteroides*.<sup>a</sup> pH óptimo (constante) para la producción de la bacteriocina.<sup>b</sup> Fase del crecimiento en la que se obtiene la actividad antimicrobiana máxima; Log.: fase logarítmica; Est.: fase estacionaria; ND: no determinada.<sup>c</sup> Caldo TGE (Tripticasa-Glucosa -Extracto de levadura);<sup>d</sup> Medio semidefinido;<sup>e</sup> El pH constante 5,5 ejerce un efecto sinérgico en la producción de las enterocinas A y B en caldo MRS suplementado con Tween 80 (0,1%, v/v), sacarosa (2%, p/v) y glucosa (0,25%, p/v);<sup>f</sup> Cultivo continuo; <sup>g</sup> Medio definido para lactobacilos (Mørseth *et al.*, 1998).

## II.4. MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

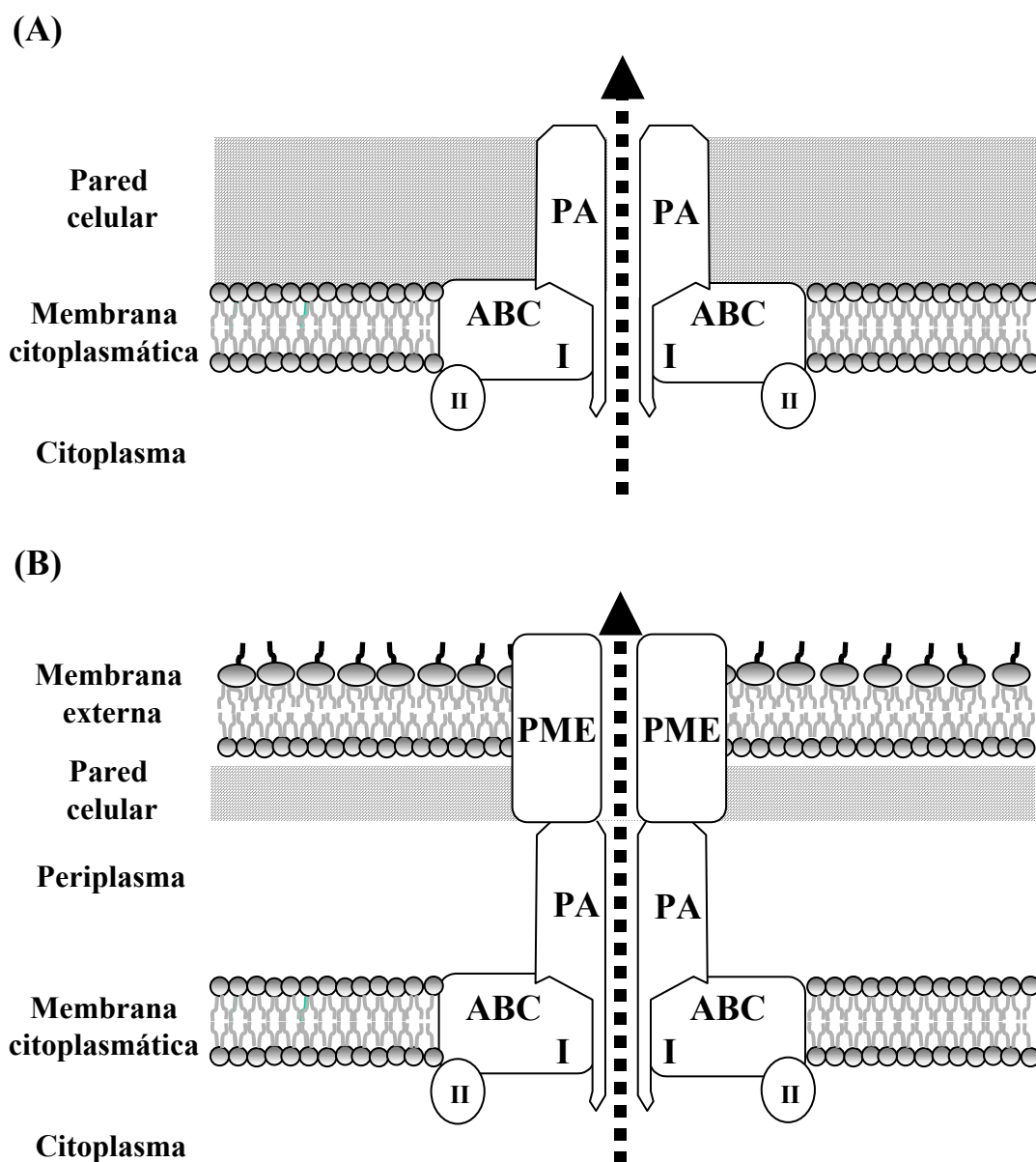
En todas las células, las proteínas extracitoplasmáticas deben translocarse a través de las bicapas lipídicas para alcanzar su destino final. La mayoría de las bacteriocinas de la clase II descritas hasta la fecha se secretan mediante transportadores del tipo ABC; no obstante, dentro de la clase II, existen bacteriocinas que, presumiblemente, se transportan mediante la ruta GSP o ruta *sec*. A continuación, se describen las características más relevantes de ambos sistemas.

### II.4.1. SISTEMAS DE SECRECIÓN DEL TIPO ABC

Los transportadores del tipo ABC (o *sec*-independientes) (Higgins, 1992; Fath y Kolter, 1993) se encuentran en bacterias Gram-positivas y negativas, en las que dirigen la secreción de una gran variedad de sustancias, tales como: (i) antibióticos y compuestos no proteicos (por ejemplo, moléculas lipofílicas y polisacáridos) (Higgins, 1992; Fath y Kolter, 1993); (ii) precursores peptídicos sintetizados con una extensión N-terminal, como el factor de competencia de *S. pneumoniae* (Håvarstein *et al.*, 1995), la colicina V de *E. coli* (Gilson *et al.*, 1990) y la mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Nes *et al.*, 1996); y (iii) péptidos que carecen de extensión N-terminal, como, por ejemplo, la hemolisina  $\alpha$  de *E. coli* (Wagner *et al.*, 1983) o, quizás, las enterocinas L50 y Q de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998b; Cintas *et al.*, 2000b). Además, los transportadores del tipo ABC son responsables de la extrusión de un amplio espectro de compuestos anfifílicos implicada en el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (MDR, del inglés *Multidrug Resistance*) (Margolles *et al.*, 1999; van Veen *et al.*, 1999, 2000).

Estos sistemas de transporte están compuestos por un miembro de la familia de los transportadores del tipo ABC, por una proteína accesoria de membrana y, en las bacterias Gram-negativas, por una proteína de la membrana externa (Fig. 2.3). Puesto que son específicos para una proteína o una familia de proteínas determinada se denominan sistemas de transporte “dedicados” (Wandersman, 1992).





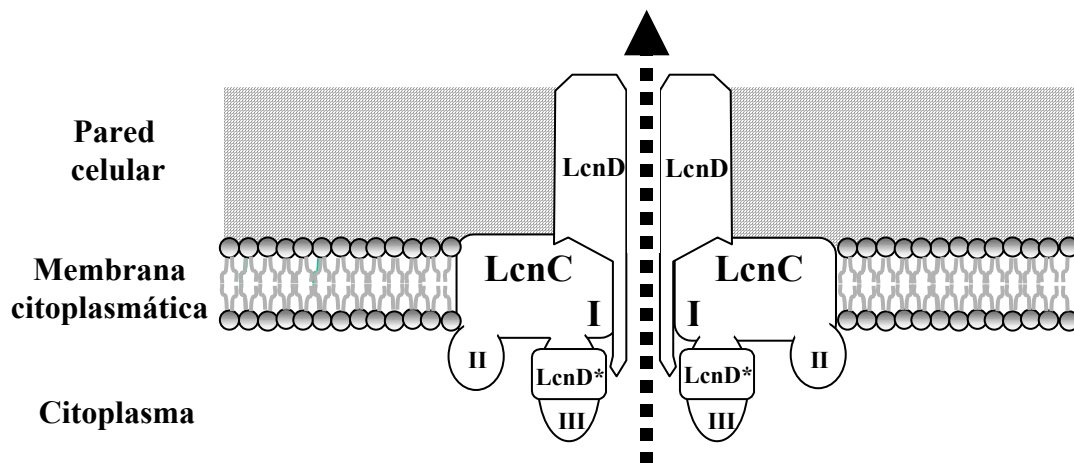
**Fig. 2.3. Representación esquemática de un sistema de secreción ABC “clásico” en bacterias Gram-positivas (A) y Gram-negativas (B).** La proteína transportadora (ABC) consta de un dominio hidrofóbico N-terminal (I), que en la mayoría de los casos contiene 6 TMS, y de un dominio C-terminal (II) que contiene los sitios de unión para el ATP. La proteína accesoria (PA) interacciona con el transportador ABC y, en las bacterias Gram-negativas, con una proteína de la membrana externa (PME), formando un canal de translocación a través de las membranas citoplasmática y, en su caso, externa. Esquema adaptado de Franke (1998).

Un transportador ABC clásico consta de un dominio hidrofóbico N-terminal integral de membrana, generalmente con seis TMS, y de un dominio C-terminal de unión para el ATP, ambos situados en el lado citoplasmático de la membrana (Håvarstein *et al.*, 1995a; Franke, 1998). Los transportadores ABC funcionales son homodímeros y constan, por tanto, de dos dominios N-terminales y dos C-terminales (Higgins, 1992; Håvarstein *et al.*, 1995a; Van Veen *et al.*, 2000). Por otra parte, la proteína accesoria presenta una corta región N-terminal en el citoplasma (aproximadamente 20 aminoácidos), estando su región C-terminal orientada hacia el lado extracelular de la membrana citoplasmática y conectada a la N-terminal mediante un único TMS (Svirsky *et al.*, 1995; Franke, 1998). Estas proteínas accesorias podrían ser las encargadas de conectar la membrana interna y externa de las bacterias Gram-negativas, por lo que también se han denominado proteínas de fusión de membrana (Dinh *et al.*, 1994). Sin embargo, su función en las bacterias Gram-positivas se desconoce en la actualidad, aunque son imprescindibles para la secreción de las bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996; Van Belkum *et al.*, 1997; Skaugen *et al.*, 2000).

Todas las bacteriocinas que se secretan mediante transportadores ABC se sintetizan como precursores caracterizados por la presencia de un doblete de glicina en las posiciones -1 y -2 de una extensión N-terminal, denominada secuencia líder del tipo doble glicina. La prebacteriocina se procesa por detrás de este doblete, liberándose la probacteriocina o, en su caso, la bacteriocina madura. Las secuencias líder de las bacteriocinas de la clase II presentan similitudes en su estructura primaria, incluyendo residuos hidrofóbicos en las posiciones -4, -7, -12 y -15, residuos hidrofílicos en las posiciones -8, -9 y -11 y un aminoácido totalmente conservado, la glicina, en posición -2 (Håvarstein *et al.*, 1994; Håvarstein *et al.*, 1995a). Las secuencias líder de la colicina V de *E. coli* y las de algunos lantibióticos poseen características similares (Frémaux *et al.*, 1993; Håvarstein *et al.*, 1994). Los lantibióticos del tipo A (sección II.2.1) pueden subdividirse en dos subclases en función de la estructura primaria y el sitio de procesamiento de su secuencia líder (de Vos *et al.*, 1995). La subclase A1, que incluye la nisina A y Z, se caracteriza por la presencia de secuencias líder moderadamente conservadas que se procesan por una serín-proteasa del tipo de la subtilasa (Siezen *et al.*, 1996) y que no están relacionadas con las de otras bacteriocinas, pues el sitio de procesamiento presenta un residuo polar o cargado en posición -1 y un residuo de prolina en posición -2 (Jack *et al.*, 1995). Por otra parte, la subclase A2, que incluye la salivaricina A (Ross *et al.*, 1993), la estreptococina A-FF22 (Hynes *et al.*, 1993), la lactocina S (Mørtvedt y Nes, 1991) y la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1992), se caracteriza por la presencia de secuencias líder similares a las del tipo doble glicina.

Recientemente se ha caracterizado el sistema de transporte de la bacteriocina de la clase II lactococcina A (Fig. 2.4) (Franke, 1998). La secreción y maduración de las lactococcinas A, B y M/N depende de las proteínas LcnC (un transportador del tipo ABC) y LcnD (una proteína accesoria), siendo ambas necesarias para la actividad extracelular de las tres lactococcinas (Stoddard *et al.*, 1992). LcnC difiere de los transportadores ABC “clásicos” descritos anteriormente en que posee una extensión N-terminal de aproximadamente 160 aminoácidos que es la responsable del procesamiento de la preprolactococcina A (Franke, 1998). Dicha extensión también aparece en los transportadores ABC implicados en la secreción de otras bacteriocinas con una secuencia líder del tipo doble glicina y contiene dos dominios muy conservados que son esenciales para el procesamiento de la preprobacteriocina. Estos dominios se denominan “dominio cisteína” (QX<sub>4</sub>D/ECX<sub>2</sub>AX<sub>3</sub>MX<sub>4</sub>Y/FGX<sub>4</sub>I/L) y “dominio histidina” (HY/FY/VVX<sub>10</sub>I/LXDP), donde X<sub>n</sub> representa el número de residuos no conservados (Håvarstein *et al.*, 1994; Håvarstein *et al.*, 1995a), lo que permite asignar dichos transportadores a la familia de las cisteín-proteasas (Håvarstein *et al.*, 1995a; Venema *et al.*, 1995). Puesto que la región N-terminal del transportador se encuentra en el citoplasma, el procesamiento de la preprobacteriocina tiene lugar en el lado citosólico de la membrana citoplasmática. Una diferencia adicional de LcnC con otros transportadores ABC es su topología de membrana, puesto que los resultados experimentales indican que LcnC posee únicamente cuatro TMS, en lugar de los seis encontrados habitualmente en este tipo de proteínas (Franke, 1998). En cuanto a LcnD, presenta la topología típica de las proteínas accesorias de membrana (Franke *et al.*, 1996).

A pesar de que no se conoce exactamente cómo los transportadores ABC de bacteriocinas reconocen a sus sustratos, el sitio de reconocimiento podría localizarse en su dominio proteolítico N-terminal (Håvarstein *et al.*, 1995a; van Belkum *et al.*, 1997; Franke, 1998; Horn *et al.*, 1998). Adicionalmente, Franke (1998) observó que la preprolactococcina A mostraba una capacidad intrínseca para insertarse en la membrana citoplasmática en presencia o ausencia de LcnC/LcnD, lo que atribuyó a la hipotética presencia de una hélice  $\alpha$  en la región C-terminal de la bacteriocina. En este sentido, dichas estructuras se han relacionado frecuentemente con la interacción con las membranas plasmáticas y la formación de poros en las células sensibles (véase sección II.5).



**Fig. 2.4. Representación esquemática del sistema de maduración y secreción de las lactococcinas.** LcnC es una proteína de la familia de los transportadores ABC, que posee un dominio integral de membrana (I), un dominio de unión para el ATP (II) y un dominio N-terminal adicional de función proteolítica (ausente en los transportadores ABC clásicos, Fig. 2.2). LcnD es la proteína accesoria de transporte y LcnD\* es una proteína formada al iniciarse la traducción de *lcnD* en un codón de iniciación alternativo. Fuente: Franke (1998).

El modelo que explica el mecanismo de transporte de los precursores de bacteriocinas que contienen péptidos líder del tipo doble glicina fue propuesto por Håvarstein *et al.* (1995a). Este modelo propone la unión de un precursor a cada uno de los dos dominios proteolíticos del homodímero del transportador ABC y la unión de dos moléculas de ATP en su dominio C-terminal; la energía liberada por la hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional en el transportador que resulta en el procesamiento y la translocación del péptido a través de la membrana. Por lo tanto, los transportadores ABC de bacteriocinas tienen una doble función que realizan simultáneamente y que consiste en el procesamiento y la translocación de precursores proteicos a través de la membrana citoplasmática, lo que representa una estrategia alternativa dentro de los mecanismos de secreción de proteínas bacterianas (Håvarstein *et al.*, 1995a).

Recientemente, la caracterización genética de las enterocinas L50 (Cintas *et al.*, 1998b) y Q (Cintas *et al.*, 2000b) ha revelado que ambas bacteriocinas se sintetizan sin ningún tipo de extensión N-terminal. Puesto que existen proteínas bacterianas que, aunque carecen de extensión N-terminal, se secretan mediante transportadores dedicados del tipo ABC, como, por ejemplo, la hemolisina  $\alpha$  de *E. coli* (del Castillo *et al.*, 1997) y las proteínas de virulencia de *Yersinia* (Yops, del inglés

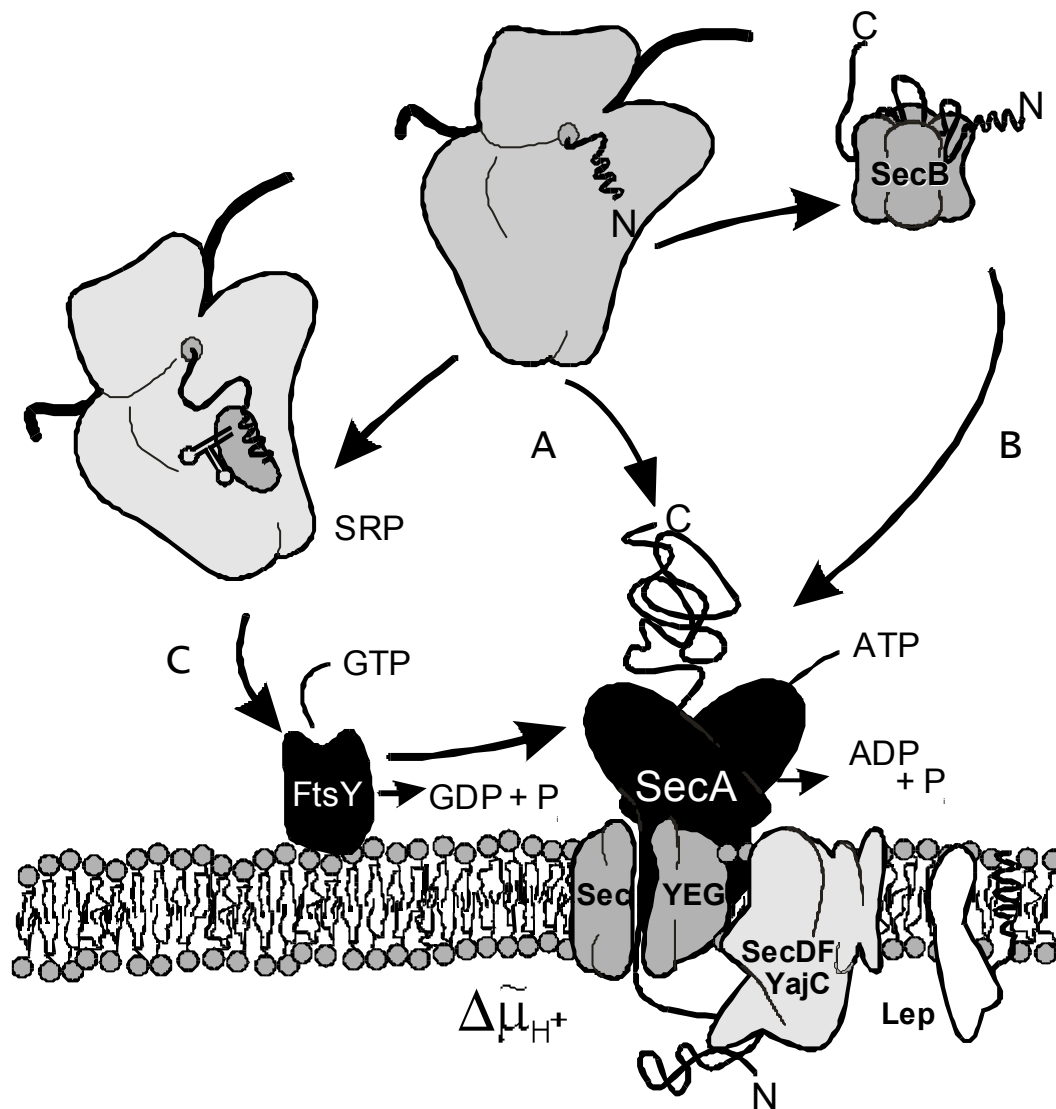
*Yersinia outer membrane proteins*) (Michiels *et al.*, 1990), la secreción de dichas enterocinas podría tener lugar asimismo mediante este tipo de transportadores.

#### II.4.2. SISTEMAS DE SECRECIÓN *sec*-DEPENDIENTES

Hasta hace poco tiempo, la presencia de una secuencia líder del tipo doble glicina había sido considerada una característica común de las bacteriocinas del tipo no-lantibiótico; sin embargo, en los últimos años se han caracterizado una serie de bacteriocinas de la clase II, como la acidocina B (Leer *et al.*, 1995), la divergicina A (Worobo *et al.*, 1995), la bacteriocina 31 (Tomita *et al.*, 1996), la enterocina P (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998) y la lactococcina 972 (Martínez *et al.*, 1999), que se sintetizan en forma de prepropéptidos (sección II.2.4.1) con una extensión N-terminal denominada péptido señal (SP, del inglés *Signal Peptide*); estas bacteriocinas se procesan y secretan mediante la ruta GSP (Pugsley, 1993; Fekkes y Driessen, 1999), en la que participan los productos de los genes *sec* y las peptidasas encargadas del procesamiento del prepropéptido (en adelante, peptidasas señal).

Las proteínas de secreción sintetizadas con un SP se transportan a través de la membrana citoplasmática para alcanzar su destino final mediante un complejo proteico denominado translocasa (Fig. 2.5) (Wickner *et al.*, 1991; Simonen y Palva, 1993; Driessen, 1994; Fekkes y Driessen, 1999). Los precursores proteicos pueden dirigirse directamente a la translocasa (Fig. 2.2, A), o bien ser conducidos hasta ella por chaperonas moleculares como SecB (Fig. 2.2, B). Alternativamente, algunas proteínas, como las integrales de membrana, alcanzan la translocasa a través de una ruta en la que intervienen la denominada partícula reconocedora de señal (SRP, del inglés *Signal Recognition Particle*) y su receptor (FtsY) (Fig. 2.2, C) (Valent *et al.*, 1995; Duong y Wickner, 1997c; Fekkes y Driessen, 1999; van der Does, 2000).

Puesto que la translocasa bacteriana estudiada en mayor profundidad es la de *E. coli*, la mayoría de las características del sistema que se describen a continuación hacen referencia a este microorganismo. No obstante, se han encontrado sistemas homólogos en *B. subtilis* (Simonen y Palva, 1983), en células eucariotas (Hartmann *et al.*, 1994) y en arqueobacterias (Pöhlschroder *et al.*, 1997).



**Fig. 2.5. Representación esquemática de los componentes de la translocasa bacteriana.** Cuando una proteína provista de un SP emerge del ribosoma puede alcanzar la translocasa postraduccionalmente o simultáneamente a su traducción. En el primer caso, la preproteína se asocia directamente con la translocasa (A) o es conducida hasta ella por SecB (B). En el segundo, la preproteína se asocia con la partícula reconocedora de señal (SRP) y, a través de FtsY, interacciona con la translocasa (C). Las proteínas se translocan a través de la membrana mediante un poro complejo integrado por los polipéptidos SecY, SecE y SecG. SecD, SecF y YajC son proteínas de membrana cuya función en el proceso de translocación permanece sin elucidar. La energía para la translocación es proporcionada por la hidrólisis del ATP por SecA. Durante o tras el proceso de translocación, el SP es cortado por la peptidasa señal Lep. Fuente: van der Does (2000).

#### II.4.2.1. El péptido señal

El péptido señal (SP) es una extensión de 18-30 aminoácidos localizada en la región N-terminal de los precursores proteicos. A pesar de carecer de homología en sus secuencias primarias, los SPs presentan tres dominios característicos con propiedades físico-químicas comunes (Silhavy *et al.*, 1983; Watson, 1984; von Heijne, 1984,1988; Izard y Kendall, 1994; Fekkes y Driessen, 1999):

- 1) Dominio N: consta de 1 a 5 aminoácidos y posee una carga neta positiva, que es mayor en los SPs de las bacterias Gram-positivas que en los de *E. coli* y eucariotas (Simonen y Palva, 1983). El dominio N interacciona con SecA (sección II.4.2.3) y con los fosfolípidos con carga negativa de la membrana citoplasmática (Akita *et al.*, 1990; von Heijne, 1990), por lo que es importante para la entrada de las preproteínas en la ruta de translocación de *E. coli* (Iino *et al.*, 1987).
- 2) Dominio H: compuesto por 7-15 residuos hidrofóbicos que pueden adoptar una conformación en hélice  $\alpha$  e insertarse en la bicapa lipídica. Este dominio podría constituir la parte más importante del SP, como sugiere el hecho de que un aumento de su hidrofobicidad total puede compensar mutaciones en otras regiones de dicho péptido (Hikita y Mizushima, 1992).
- 3) Dominio C: de carácter polar e integrado por 3-7 aminoácidos, constituye la única región del SP que requiere cierta especificidad en su secuencia primaria, puesto que interacciona con la peptidasa señal (Dalbey y von Heijne, 1992). Las peptidasas líder del tipo I de *E. coli* (que actúan sobre preproteínas, a diferencia de las del tipo II, que son específicas de lipoproteínas) presentan especificidad en las posiciones -3 y -1 con respecto al inicio del propéptido; estas posiciones aparecen generalmente ocupadas por aminoácidos con cadenas laterales cortas y neutras, tales como alanina, glicina, serina o treonina (von Heijne, 1984, 1988). La peptidasa señal corta el SP cuando éste emerge en el lado periplásmico de la membrana (Schiebel *et al.*, 1991) y se libera el propéptido. Finalmente, un grupo de proteínas que asiste a otras en la modificación de su composición o en el desarrollo de su actividad funcional o metabólica (chaperonas) posibilita que el propéptido adquiera su conformación nativa final.

#### II.4.2.2. SecB

SecB es una chaperona molecular citosólica de *E. coli* que guía a ciertos precursores proteicos a la membrana citoplasmática (Driessen, 1994; Kumamoto, 1991) y de la que, hasta ahora, únicamente se han encontrado homólogos en bacterias Gram-negativas. Se trata de una proteína no esencial para el proceso de translocación que, *in vitro*, interacciona de forma no selectiva con la

región madura de cualquier precursor proteico que no se encuentre en su conformación nativa y retarda su plegamiento, manteniéndolo en un estado competente para la translocación (Collier *et al.*, 1988; Driessen, 1994; Fekkes *et al.*, 1995). La función de SecB en el proceso de translocación proteica está relacionada con su gran afinidad por SecA, lo que permite el movimiento rápido y específico de los precursores proteicos hacia la membrana y su interacción con SecA (Driessen, 1994; Hartl *et al.*, 1990)

#### II.4.2.3. SecA

SecA es una proteína con actividad ATPasa que se halla unida periféricamente al complejo de proteínas integrales de membrana de la translocasa (Wickner *et al.*, 1991). Esta proteína, cuya forma funcional es un homodímero (Driessen, 1993), interacciona con la práctica totalidad de los componentes del proceso de translocación, posee actividad ATPasa y regula su expresión génica mediante la unión a su propio mRNA (Driessen *et al.*, 1995b).

Cuando se encuentra unida al complejo integral de membrana de la translocasa, SecA presenta una gran afinidad por SecB, el SP y la región madura de las preproteínas (Akita, 1990; Hartl *et al.*, 1990). La unión del precursor proteico a SecA estimula el intercambio de ADP por ATP en uno de sus dos sitios de unión de ATP (Lill *et al.*, 1990) y causa la inserción de SecA y de parte del precursor en la membrana. La desinserción de SecA de la membrana, así como la liberación de la preproteína y su entrada en la ruta de translocación, son procesos que requieren la hidrólisis de ATP (Economou y Wickner, 1994).

#### II.4.2.4. Componentes integrales de membrana de la translocasa

El dominio integral de membrana de la translocasa es un complejo hexamérico compuesto por los polipéptidos SecY, SecE, SecG, SecD, SecF y YajC (Driessen, 1994; Duong y Wickner, 1997c; Manting, 1999; Van der Does, 2000). SecY y SecE forman un complejo estable en la membrana que constituye el núcleo de la translocasa (Joly *et al.*, 1994) y que es esencial para el proceso de translocación *in vivo* e *in vitro* (Wickner *et al.*, 1991). SecG es una proteína que se copurifica y coinmunoprecipita con SecY y SecE, y que, a pesar de no ser esencial *per se* para el proceso de translocación (Akimaru *et al.*, 1991), aumenta considerablemente su eficiencia (Hanada *et al.*, 1994). SecYEG podría funcionar como un canal conductor de precursores proteicos a través de la membrana citoplasmática (Meyer *et al.*, 1999) mediante la formación de complejos tetraméricos en



cuyo ensamblaje participaría el homodímero SecA (Manting *et al.*, 2000). SecYEG puede asociarse con otro complejo heterotrimérico constituido por las proteínas SecD, SecF y YajC (Duong y Wickner, 1997a), lo que incrementa adicionalmente la eficiencia de la reacción de translocación. La función de dichas proteínas no se conoce con exactitud, aunque se ha propuesto su participación en el control de los ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana (Duong y Wickner, 1997a,b), en el mantenimiento de la fuerza protón motriz (Fig. 2.8, sección II.5) durante el proceso de translocación (Arkowitz y Wickner, 1994) y en la liberación de las proteínas translocadas al lado periplásmico de la membrana (Matsuyama *et al.*, 1993).

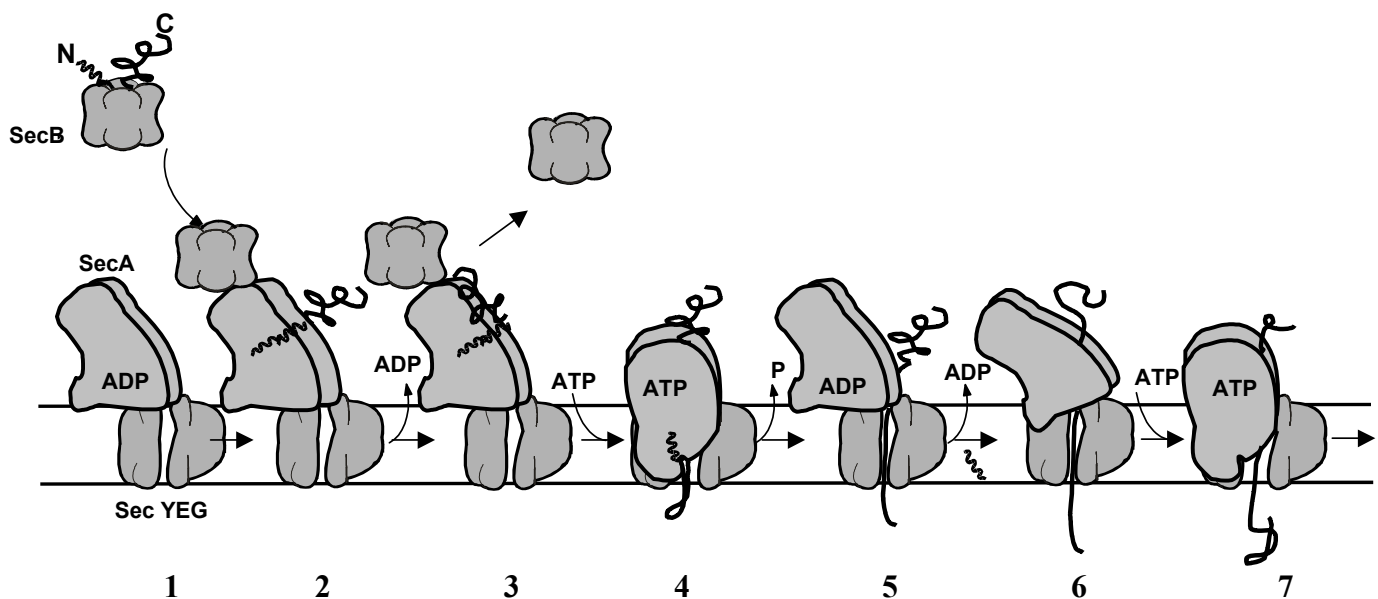
#### II.4.2.5. Mecanismo de translocación proteica

El modelo propuesto para la translocación de precursores proteicos a través de la membrana citoplasmática de *E. coli* se muestra en la Fig. 2.6. De acuerdo con este modelo, las preproteínas se translocan mediante un mecanismo de varias etapas consistente en ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana acoplados a la hidrólisis de ATP.

En el caso de las preproteínas que alcanzan la translocasa dirigidas por SecB, el proceso de translocación comienza con la unión de SecB a SecA, que, a su vez, se encuentra unida a SecYEG (Fig. 2.6, 1) (Hartl *et al.*, 1990). Como consecuencia de su interacción con SecA, SecB libera el precursor y lo transfiere a SecA (Fig. 2.6, 2) (Fekkes *et al.*, 1997). La unión de la preproteína origina el intercambio de ADP por ATP y la liberación de SecB (Fig. 2.6, 3) (Fekkes *et al.*, 1997); a continuación, se produce un cambio conformacional en SecA que propicia la inserción de algunos de sus dominios en la membrana (Economou y Wickner, 1994; Lill *et al.*, 1989; van der Does *et al.*, 1998). La inserción en la membrana de SecA-ATP resulta en la translocación del SP y de una parte del péptido maduro (Fig. 2.6, 4) (Schiebel *et al.*, 1991). A continuación, la hidrólisis de ATP revierte el cambio conformacional de SecA y causa su desinserción de la membrana y la liberación de la preproteína en el canal de translocación (Fig. 2.6, 5) (Economou y Wickner, 1994; Schiebel *et al.*, 1991). En este momento, SecA-ADP puede unirse de nuevo a la preproteína, produciendo la translocación de 2-2,5 kDa (Fig. 2.6, 6). Asimismo, la unión a la preproteína estimula de nuevo el intercambio de ADP por ATP y el consiguiente cambio conformacional en SecA, lo que permite la translocación de otros 2-2,5 kDa adicionales (Fig. 2.6, 7) (Economou y Wickner, 1994; Schiebel *et al.*, 1991; Uchida *et al.*, 1995). Por lo tanto, un ciclo catalítico de la translocasa permitiría la translocación de segmentos de 5 kDa del precursor mediante dos etapas sucesivas: primero unos 2,5

kDa tras la unión de SecA al polipéptido y, después, otros 2,5 kDa tras la unión de ATP a SecA (van der Wolk *et al.*, 1997).

Aunque *in vitro* la hidrólisis del ATP es suficiente para la translocación proteica (Schiebel *et al.*, 1991), *in vivo*, la fuerza protón motriz es también un componente esencial de dicha reacción (Driessen, 1992). La hidrólisis del ATP y la fuerza protón motriz actúan en diferentes etapas del proceso de translocación, siendo la primera imprescindible para su iniciación y la segunda para energizar etapas más tardías y proporcionar unidireccionalidad a dicho proceso (Driessen, 1992; Duong y Wickner, 1997c; Schiebel *et al.*, 1991). En la actualidad, no se ha determinado el mecanismo molecular por el que la PMF interviene en la translocación proteica.



**Fig. 2.6. Modelo para la translocación en etapas de los precursores proteicos provistos de un SP.** En la preproteína, el trazo en forma de sacacorchos representa el SP, y el trazo continuo representa su región madura. Los detalles del proceso de translocación se explican en el texto. Fuente: van der Does (2000).

## II.5. MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS Y OTROS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL

En los últimos años se han descrito una gran cantidad de péptidos con actividad antimicrobiana (Hancock y Falla, 1995; Hancock y Chapple, 1999), que, atendiendo a su biosíntesis, se pueden clasificar en dos grandes grupos: (i) péptidos de síntesis no ribosomal, como las gramicidinas, polimixinas, bacitracinas, glicopéptidos, etc., producidos por bacterias, hongos y estreptomicetos; y (ii) péptidos de síntesis ribosomal, producidos de forma constitutiva o inducible por multitud de especies animales, vegetales y bacterianas e implicados en su sistema de defensa natural (Tabla II.2, sección II.2.1) (Boman, 1995; Bechinger, 1999; Epand y Vogel, 1999; Hancock y Chapple, 1999). Con el objeto de proporcionar una defensa eficaz a las células que los producen, los péptidos antimicrobianos defensivos deben presentar las siguientes propiedades (Matsuzaki, 1999): (i) toxicidad selectiva, es decir, capacidad de distinción entre las células productoras y las células diana; (ii) acción antibiótica rápida; (iii) espectro antibacteriano amplio; y (iv) baja inducción de resistencias microbianas.

La rápida emergencia de poblaciones bacterianas resistentes a numerosos antibióticos en especies con un elevado potencial patógeno ha incrementado el interés por el desarrollo de nuevos compuestos que proporcionen una protección más eficaz frente a las toxiinfecciones bacterianas (Bechinger, 1999; Epand y Vogel, 1999; Lohner y Prenner, 1999; Moll *et al.*, 1999a). Entre estos compuestos se encuentran los péptidos antimicrobianos naturales de síntesis ribosomal, particularmente los que exhiben actividad inmunológica, antitumoral, antifúngica y/o antivírica sin ser hemolíticos ni citotóxicos para las células sanas de vertebrados (Bechinger, 1999). El empleo de estos péptidos en la industria farmacológica, así como el diseño de nuevos péptidos con una potencia y especificidad mejoradas, requiere la comprensión de su mecanismo de acción y de sus relaciones estructura-función (Epand y Vogel, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Lohner y Prenner, 1999).

Aunque los péptidos antimicrobianos eucarióticos y procarióticos se producen y actúan en circunstancias diferentes, estos sistemas poseen elementos comunes a nivel molecular. Por lo tanto, el conocimiento de los péptidos antimicrobianos eucarióticos es relevante en el estudio de los procarióticos y viceversa (Nissen Meyer y Nes, 1997). Por ello, dado que se han realizado un elevado número de estudios sobre el mecanismo molecular de acción de los primeros, y que ambos comparten ciertas características, se ha considerado oportuno exponer las principales propiedades

de los péptidos antimicrobianos eucarióticos con el objeto de compararlas con las de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.

## **II.5.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EUCARIÓTICOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL**

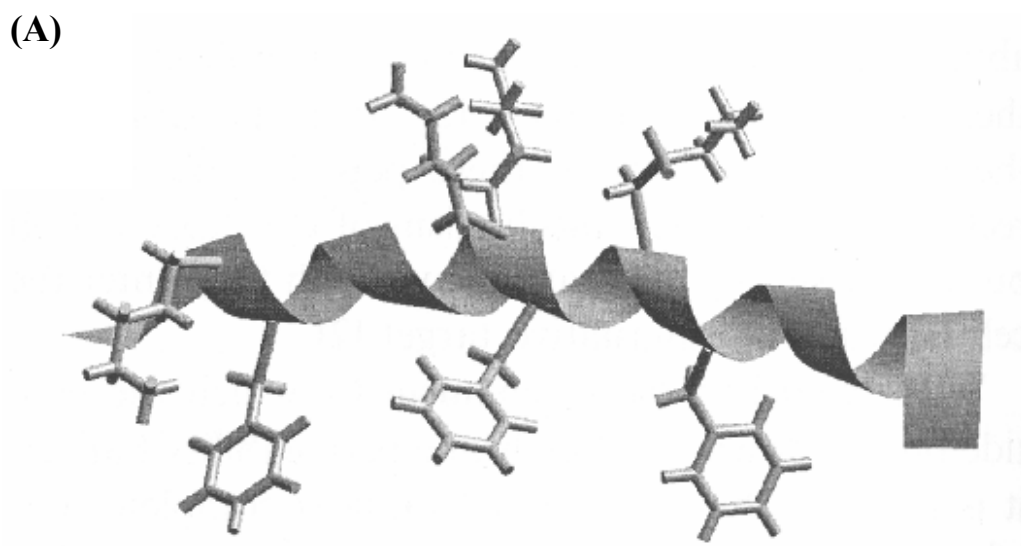
### **II.5.1.1 Estructura proteica**

Los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal muestran una escasa homología en su secuencia primaria, pero tienen en común su naturaleza catiónica y anfipática, lo que les confiere la capacidad de interaccionar con las membranas bacterianas (Epand y Vogel, 1999; Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Sitaram y Nagaraj, 1999). Estos péptidos adoptan fundamentalmente dos tipos de estructura secundaria: (i) hélice  $\alpha$  o (ii) conformación  $\beta$  en lámina plegada antiparalela. La estructura helicoidal consta generalmente de una hélice  $\alpha$  anfifílica de 9-16 aminoácidos cerca del extremo N-terminal, un giro de 2-4 residuos y una hélice hidrofóbica de 11-14 aminoácidos cerca del extremo C-terminal. Entre los péptidos que adoptan estructuras de este tipo se encuentran las cecropinas de insectos, la melitina del veneno de la abeja de la miel europea y las magaininas (Fig. 2.7A) de la piel de ranas (Bechinger, 1997). Por otra parte, los péptidos con estructura en lámina  $\beta$  están representados por las defensinas (Ganz y Lehrer, 1997); estas moléculas presentan una estructura en lámina  $\beta$  antiparalela junto con una pequeña región en triple lámina  $\beta$ , y con las cadenas conectadas mediante puentes disulfuro (Fig. 2.7B). Otros péptidos antimicrobianos pueden asumir conformaciones secundarias distintas debido a la presencia de un alto porcentaje de aminoácidos específicos, tales como los péptidos de origen bovino ricos en Pro y Arg (bactenecinas) o en Pro y Trp (indolicidina) (Falla *et al.*, 1996).

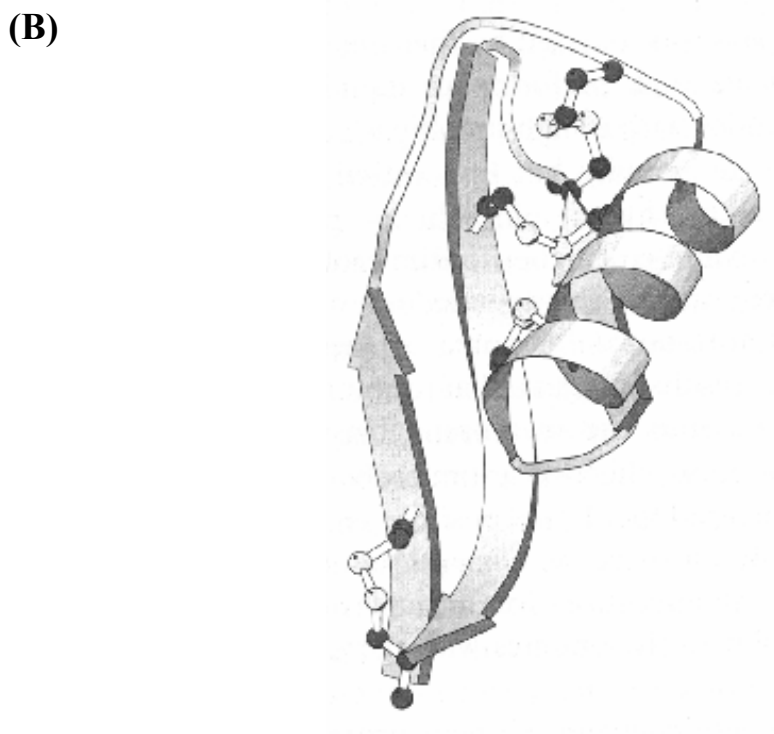
### **II.5.1.2. Relaciones estructura-función**

Con el objeto de comprender la especificidad de acción de los péptidos antimicrobianos y de optimizar su actividad, se han realizado numerosos estudios acerca de la influencia de una serie de parámetros estructurales en la modulación de dicha selectividad y especificidad. Entre estos parámetros se encuentran:

(A)



(B)



**Fig. 2.7. Estructura secundaria de algunos péptidos antimicrobianos eucarióticos.** (A) Estructura de la magainina en presencia de micelas de SDS. Las cadenas laterales de los residuos de lisina y fenilalanina aparecen indicadas, mostrando la naturaleza catiónica y anfipática de esta estructura; (B) Estructura de la purotionina (defensina vegetal); los puentes disulfuro se representan mediante esferas y barras. Fuente: Epand y Vogel (1999).

(1) *Estructura helicoidal*: esta estructura, caracterizada por el alineamiento de los residuos hidrofóbicos y de las cadenas laterales de los aminoácidos polares en lados opuestos de la hélice, permite una interacción óptima con las membranas biológicas. Los cambios realizados en la secuencia aminoacídica con el objeto de incrementar el contenido en hélice  $\alpha$ , como por ejemplo, la eliminación o sustitución de Gly y Pro, se correlacionan con el aumento de la actividad hemolítica y antimicrobiana de la magainina, la cecropina y la pardaxina (Dathe y Wieprecht, 1999). Asimismo, las sustituciones que dificultan la adopción de esta estructura secundaria resultan en la reducción de la actividad hemolítica y antimicrobiana de la melitina. Estas observaciones demuestran la importancia general de la estructura en hélice  $\alpha$  para la interacción con las membranas biológicas, aunque este parámetro podría tener mayor relevancia en las bicapas neutras que en las que poseen carga negativa (Dathe y Wieprecht, 1999).

(2) *Momento hidrofóbico*: este parámetro, calculado a partir de la suma vectorial de la hidrofobicidad de los aminoácidos individuales, es una medida de la anfipaticidad del péptido. Los péptidos que actúan en la membrana poseen una región con un momento hidrofóbico alto y una hidrofobicidad moderada. El efecto del momento hidrofóbico en la actividad de los péptidos antimicrobianos es variable, pero, de manera similar a lo expuesto para la estructura helicoidal, el momento hidrofóbico podría resultar más importante en la permeabilización de membranas neutras que en aquellas cargadas negativamente (Dathe y Wieprecht, 1999).

(3) *Hidrofobicidad*: este parámetro refleja la capacidad del péptido para moverse desde una fase acuosa a otra hidrofóbica. Con respecto a la hidrofobicidad, los péptidos deben cumplir dos requisitos: (i) ser lo suficientemente solubles en agua para ser almacenados en concentraciones elevadas en la célula productora y transportados a las células diana; y (ii) ser lo suficiente hidrofóbicos para alterar la permeabilidad de la membrana (Dathe y Wieprecht, 1999). Puesto que la influencia de la hidrofobicidad es mayor en la actividad hemolítica que en la antimicrobiana, este parámetro podría utilizarse para incrementar la especificidad antimicrobiana de estos compuestos.

(4) *Carga*: la función de las cargas positivas de los péptidos antimicrobianos en la interacción con las cargas negativas de las membranas bacterianas es un hecho reconocido (Sitaram y Nagaraj, 1999; Chen *et al.*, 1997b). Puesto que la interacción péptido-membrana está determinada por un balance de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, el refuerzo de las primeras y el mantenimiento de un dominio hidrofóbico en la hélice  $\alpha$  podrían aumentar su selectividad frente a los procariotas. En general, la influencia de la carga del péptido es mayor en aquellos péptidos que carecen de una región hidrofóbica bien desarrollada (Dathe y Wieprecht, 1999).

En resumen, el balance entre la actividad antimicrobiana y la hemolítica podría optimizarse mediante la modificación de determinados parámetros estructurales del péptido; no obstante, puesto que la actividad de cada péptido está determinada por una combinación única de parámetros, la optimización general de la actividad y especificidad es un objetivo complicado.

### **II.5.1.3. Modelos propuestos para explicar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos**

A pesar de que se han realizado numerosos estudios en este contexto, el modo de acción de los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal y su especificidad frente a determinadas células sigue siendo objeto de debate (Epand y Vogel, 1999; Lohner y Prenner, 1999; Shai, 1999). Aunque existen evidencias de que una de las dianas de estos péptidos es la bicapa lipídica de la membrana (Bechinger, 1999; Epand y Vogel, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Lohner y Prenner, 1999; Matsuzaki, 1999; Shai, 1999), el mecanismo molecular de perturbación de la membrana y su relación con la actividad antimicrobiana no se conocen con exactitud (Blondelle *et al.*, 1999; Epand y Vogel, 1999). En este sentido, se ha propuesto recientemente que el efecto de estos péptidos en la membrana podría no estar directamente relacionado con su acción antimicrobiana, sino representar simplemente la forma en la que acceden al citoplasma para alcanzar una diana alternativa, como el DNA o ciertas enzimas autolíticas (Epand y Vogel, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Wu *et al.*, 1999). De hecho, el efecto sobre la membrana citoplasmática es tan rápido que resulta difícil determinar la existencia de otras dianas intracelulares. Recientemente, Martínez *et al.* (2000) han demostrado que la bacteriocina lactococcina 972 inhibe la formación de septos durante la división de células de *L. lactis* sensibles a dicha bacteriocina.

La primera barrera celular a la que se enfrentan los péptidos catiónicos y anfifílicos es la membrana externa de los microorganismos Gram-negativos o la pared celular de los Gram-positivos. Algunos péptidos tienen la capacidad de unirse a los lipopolisacáridos (LPS) polianiónicos de la membrana externa de los Gram-negativos (o a otros componentes de la pared celular de los Gram-positivos), lo que podría resultar en el desplazamiento de los cationes divalentes que estabilizan estas moléculas y en la alteración de la permeabilidad de la membrana externa. Este mecanismo, denominado de “captación autoinducida”, facilitaría el acceso de los péptidos a la membrana citoplasmática de los microorganismos Gram-negativos (Falla, 1996; Epand y Vogel, 1999; Hancock y Lehrer, 1998; Hancock y Chapple, 1999). Además, puesto que los LPS están implicados en la fisiopatología del *shock* endotóxico causado por bacterias Gram-

negativas, aquellos agentes con capacidad para unirse a los LPS liberados a la corriente sanguínea podrían neutralizar dicha acción tóxica, lo que representaría una ventaja frente a los antibióticos convencionales, que en algunos casos estimulan la liberación de endotoxinas (Hancock y Chapple, 1999; Scott *et al.*, 1999).

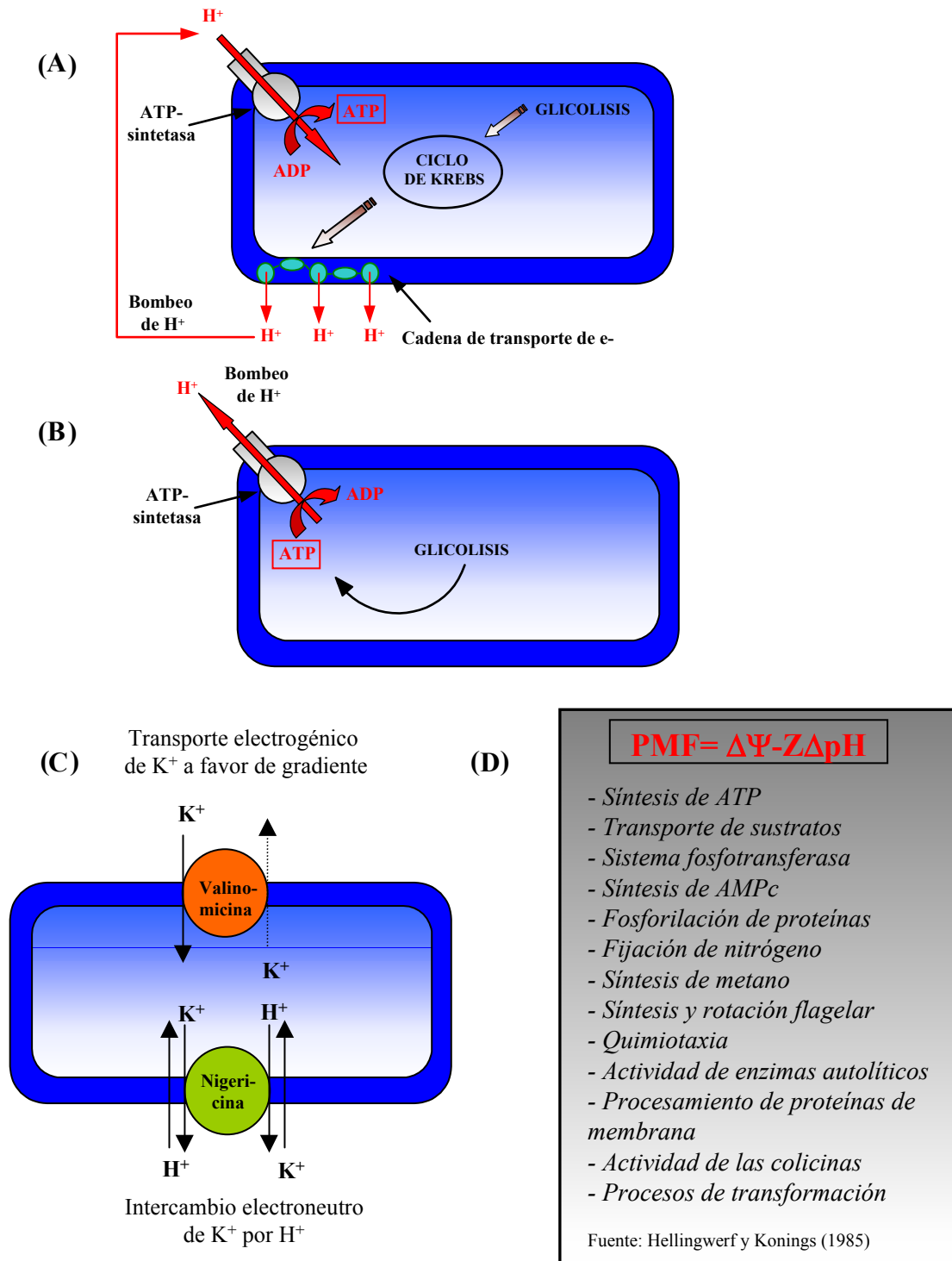
Una vez atravesada la barrera inicial, los péptidos antimicrobianos interaccionan con la membrana plasmática. Esta estructura se encarga, entre otras funciones, del mantenimiento de la integridad del citoplasma, del transporte de solutos al interior o exterior celular, de la generación y el mantenimiento del estado energético celular y de la síntesis de ATP (Hancock *et al.*, 1995).

En las bacterias, la energía metabólica se almacena en forma de intermediarios redox, como el NADH, o de intermediarios ricos en energía, como el ATP. Como se muestra en la Fig. 2.8A, la oxidación de los intermediarios redox, realizada por la cadena de transporte de electrones de la membrana plasmática de las bacterias aerobias, está acoplada a la extrusión de  $H^+$  desde el citoplasma al medio exocelular y a la síntesis de ATP por la ATP-sintetasa; sin embargo, en las bacterias anaerobias, que carecen de la cadena de transporte de electrones, la extrusión de  $H^+$  mediante la ATP-sintetasa requiere la hidrólisis del ATP (Fig. 2.8B). Puesto que la membrana citoplasmática es impermeable a los  $H^+$ , su translocación genera en ambos casos un gradiente electroquímico transmembrana que consta de un componente eléctrico, el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ , negativo en el interior) y uno químico, el gradiente de pH ( $\Delta pH$ , alcalino en el interior). La teoría quimiosmótica de Mitchell (1966) establece que el gradiente electroquímico ejerce una fuerza sobre los  $H^+$  dirigida hacia el interior, que se denomina fuerza protón motriz (PMF, del inglés *Proton Motive Force*) y que puede expresarse como:

$$PMF = \Delta\Psi - Z\Delta pH \text{ (mV)},$$

donde  $Z = 2,3 RT/F$ , siendo R la constante de los gases, T la temperatura absoluta y F la constante de Faraday; el parámetro Z transforma el gradiente de pH en milivoltios y tiene un valor de, aproximadamente, 60 mV por unidad de pH a 25°C (Hellingwerf y Konings, 1985). Por convención, la PMF se considera negativa y alcalina en el interior de la célula. En los microorganismos aerobios, la PMF alcanza valores de -200 mV, mientras que en los anaerobios oscila entre -100 y -150 mV (Hellingwerf y Konings, 1985; Montville y Bruno, 1994). En las bacterias estrictamente fermentativas, la excreción de  $H^+$  acoplada a productos finales del metabolismo (como, por ejemplo, el ácido láctico) contribuye a la generación adicional de energía





**Fig. 2.8. Generación de la PMF en bacterias aerobias (A) y anaerobias (B). Mecanismo de acción de los ionóforos valinomicina y nigericina (C). Procesos en los que interviene la PMF (D).**

electroquímica en estos microorganismos (ten Brink *et al.*, 1982, 1985). Como se observa en la Fig. 2.8C, los ionóforos valinomicina y nigericina, ampliamente empleados en los estudios del estado energético de la membrana plasmática, actúan sobre ésta disipando el  $\Delta\Psi$  y el  $\Delta pH$ , respectivamente.

La PMF es la fuerza vital para un gran número de procesos que requieren energía, tales como la síntesis de ATP, el transporte de determinados sustratos, la síntesis y la rotación de flagelos, etc. (Fig. 2.8D); por lo tanto, la alteración de uno o ambos de sus componentes como consecuencia de la acción de los péptidos antibacterianos sobre la membrana podría constituir una de las causas principales de la actividad bactericida de dichos péptidos.

La asociación de los péptidos antimicrobianos con la membrana plasmática y la alteración de su permeabilidad está mediada por las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos no polares y el núcleo hidrofóbico de la membrana y las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de los péptidos y las negativas de las cabezas de los fosfolípidos (Bechinger, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Matzusaki, 1999; Shai, 1999). En general, la presencia en la monocapa externa de las membranas bacterianas de cargas negativas, fundamentalmente fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL), y de potenciales transmembrana altos (negativos en el interior) aumenta la concentración local de los péptidos en la superficie de las mismas y favorece su asociación (Bechinger, 1999; Lohner y Prenner, 1999; Matsuzaki, 1999). Sin embargo, la presencia de lípidos zwitteriónicos o neutros, fundamentalmente fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina, constituyentes principales de la monocapa externa de las membranas eucarióticas, dificulta la unión de moléculas adicionales del péptido a la superficie de la membrana debido a un fenómeno de repulsión. Así, la composición de las membranas de las células eucarióticas sanas, sin lípidos ácidos en la cara externa de la membrana y ricas en colesterol (que afecta a la fluidez y al momento dipolar de las membranas), podría contribuir a la acción selectiva de estos péptidos (Hancock *et al.*, 1995; Bechinger, 1999; Matsuzaki, 1999; Sitaram y Nagaraj, 1999). A pesar de que la hidrofobicidad de los péptidos de defensa no es lo bastante alta como para asociarse con los lípidos zwitteriónicos de las membranas eucarióticas, algunas toxinas y venenos (como la melitina) son lo suficientemente hidrofóbicos para ejercer actividad hemolítica (Matzusaki, 1999). Las células tumorales constituyen un caso particular, ya que, como consecuencia de la pérdida de asimetría lipídica, poseen un carácter más aniónico en el exterior (debido principalmente al incremento en la concentración de fosfatidilserina) que las hace ser más sensibles a ciertos péptidos antimicrobianos, como magaininas y cecropinas (Bechinger, 1997; Sitaram y Nagaraj, 1999). En cualquier caso, la observación de que

ciertos péptidos antimicrobianos muestran preferencia por determinados fosfolípidos ácidos indica que otras propiedades, además de la carga, influyen en su interacción con las membranas biológicas (Bechinger, 1999; Epand y Vogel, 1999)

Tras la fase inicial de unión, los péptidos pueden insertarse en la bicapa lipídica. En este sentido, se ha observado que, en general, por debajo de una concentración umbral los péptidos se sitúan paralelamente a la membrana y que por encima de dicha concentración pueden orientarse perpendicularmente a la misma (Lohner y Prenner, 1999). Teniendo en cuenta la corta longitud de algunos péptidos antimicrobianos, insuficiente para atravesar la bicapa lipídica, éstos deberían agregarse y formar estructuras multiméricas para poder cruzarla (Hancock *et al.*, 1995).

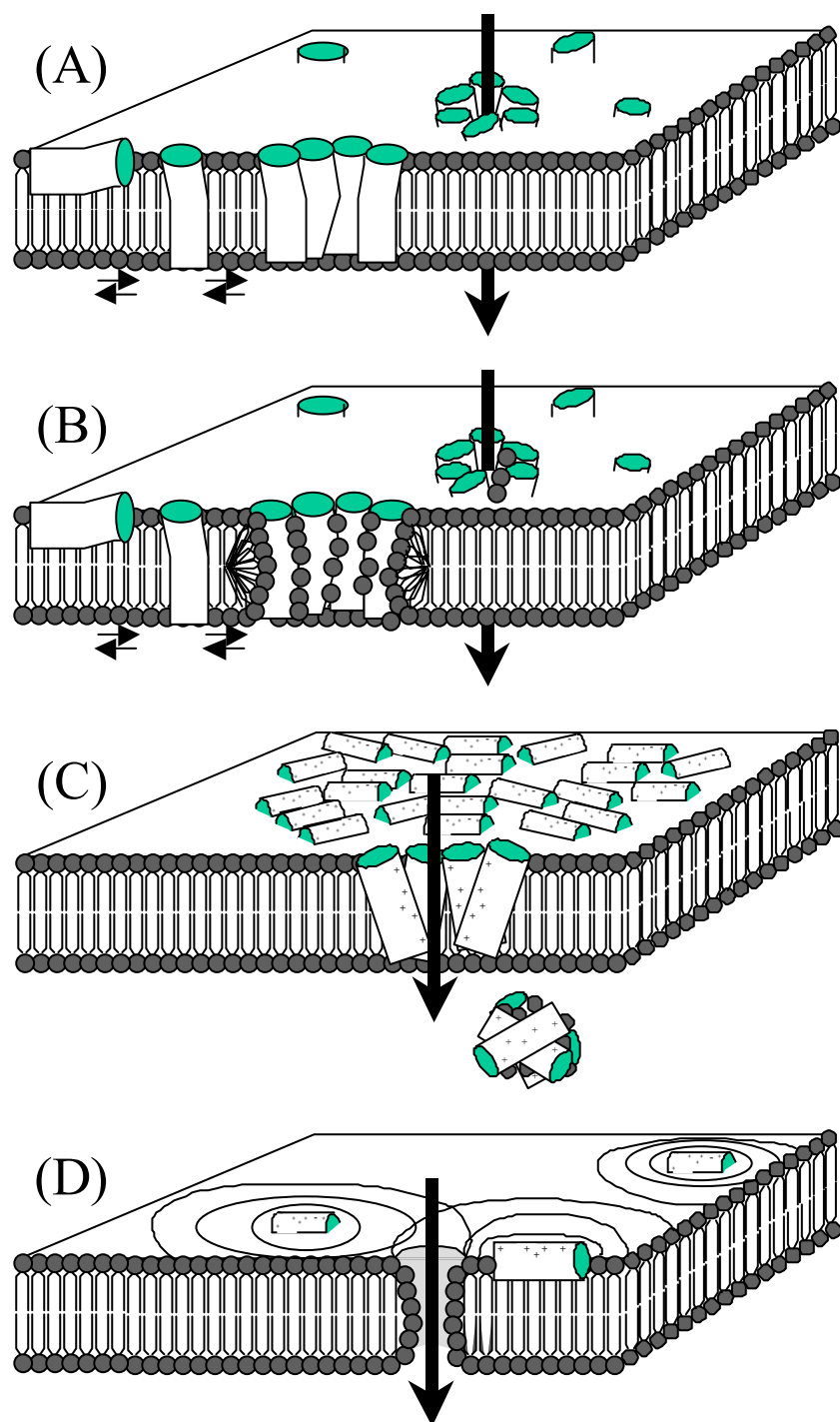
Una vez expuestas las etapas fundamentales de la interacción péptido-membrana, se muestran los principales modelos propuestos para explicar su acción antimicrobiana en las células bacterianas sensibles (Fig. 2.9) (Bechinger, 1999).

#### **II.5.1.3.1. Modelo de haces de hélices transmembrana**

El modelo de haces de hélices transmembrana (del inglés *Transmembrane helical-bundle model*), también denominado “en duela de barril”, se propuso inicialmente para explicar el mecanismo de acción de la alameticina, un péptido de 20 aminoácidos, aniónico e hidrofóbico, producido por el hongo *Trichoderma viride* (Bechinger, 1997). El modelo implica la unión a la membrana plasmática de monómeros con estructura en hélice  $\alpha$ , su agregación e inserción en la misma y el posterior “reclutamiento” de monómeros adicionales para formar poros. En los poros, las caras hidrofílicas de las hélices  $\alpha$  se dirigen hacia el interior de cavidades llenas de agua, mientras que las superficies hidrofóbicas interaccionan con el núcleo hidrofóbico de la membrana (Bechinger, 1997; Bechinger, 1999; Shai, 1999) (Fig. 2.9A).

#### **II.5.1.3.2. Modelo toroidal**

El modelo anterior permite explicar el mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos predominantemente hidrofóbicos, pero en el caso de los péptidos catiónicos podría resultar en la acumulación excesiva de residuos cargados positivamente en un volumen muy pequeño. Además, la selectividad de algunos péptidos por determinados cationes contrasta con la alta densidad de carga positiva que alcanzarían en un poro oligomérico (Bechinger, 1999). Por lo tanto, el modelo de haces



**Fig. 2.9. Modelos propuestos para explicar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.** (A) Modelo de haces de hélices transmembrana; (B) Modelo toroidal; (C) Modelo de alfombra; (D) Modelo de difusión en el plano. Los detalles del funcionamiento de cada uno de estos modelos se explican en el texto. Fuente: Bechinger (1999).

de hélices transmembrana se ha modificado de manera que los lípidos de la membrana plasmática, junto con los péptidos, rodean las paredes de aperturas toroidales (Matzusaki, 1999; Sitaram y Nagaraj, 1999). El modelo toroidal (del inglés *Wormhole/Toroidal model*) se propuso inicialmente para explicar la actividad antimicrobiana de las magaininas, péptidos de la piel y del intestino de las ranas, que exhiben actividad antibacteriana, fungicida, antivírica y antitumoral (Bechinger, 1997). Según este modelo, la molécula se sitúa paralelamente a la membrana, empuja a las cabezas polares de los fosfolípidos hacia los lados y produce una distorsión local de la región hidrofóbica; a continuación, la membrana se adelgaza localmente para rellenar el hueco y, a medida que aumenta su energía de deformación, el péptido adopta una orientación transmembrana y agrega con otros péptidos, formando un poro por el que pueden fluir iones (Fig. 2.9B). La duración de los poros es limitada, ya que existen fuerzas electrostáticas entre las cadenas laterales de los monómeros que inducen a que los poros se desintegren y los péptidos se transloquen estocásticamente a la monocapa interior. Puesto que la formación de poros es un proceso cooperativo, la translocación del péptido a la cara interna de la bicapa reduce el número de monómeros unidos en la cara externa y, por lo tanto, el sistema tiende hacia un equilibrio en el que los poros desaparecen (Matsuzaki, 1999).

#### II.5.1.3.3. Modelo de “alfombra”

Los modelos que proponen una orientación transmembrana de los péptidos son difíciles de compatibilizar con la observación de que péptidos sintéticos de tan solo 11-15 aminoácidos, es decir, demasiado cortos para poder atravesar la membrana, muestran una potente actividad antimicrobiana (Bechinger, 1999). El modelo de “alfombra” (del inglés *Carpet model*) establece que los péptidos antimicrobianos: (i) presentan inicialmente una orientación paralela a la superficie de la membrana plasmática; (ii) no requieren la adopción de una estructura secundaria específica tras su unión a la membrana; (iii) están en contacto con las cabezas lipídicas durante todo el proceso; y (iv) no se insertan en el núcleo hidrofóbico de la membrana (Shai, 1999).

El modelo se propuso para explicar el mecanismo de acción de la dermaseptina, un péptido antimicrobiano aislado de la piel de ranas (Mor y Nicolas 1994). En presencia de concentraciones altas del péptido y de fosfolípidos ácidos, las moléculas de dermaseptina se alinean en la superficie de la membrana, con su cara hidrofílica orientada hacia las cabezas de los fosfolípidos o las moléculas de agua, y se asocian formando una “alfombra”. A continuación, las moléculas rotan y reorientan sus residuos hidrofóbicos hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana. Finalmente, se

produce la desintegración de la membrana debido a la alteración de la curvatura de la bicapa lipídica. En un estadio intermedio, previo a la lisis total, se pueden formar poros toroidales que permitan el paso de solutos de pequeño tamaño molecular (Fig. 2.9C) (Bechinger, 1999; Shai, 1999).

#### **II.5.1.3.4. Modelo de difusión en el plano**

La formación de oligómeros es factible cuando se alcanzan concentraciones locales elevadas del péptido; sin embargo, se ha observado que la concentración de péptido necesaria para disipar el gradiente iónico o para obtener actividad antibiótica es comparativamente menor. En consecuencia, se ha propuesto el modelo de difusión en el plano (del inglés *In-plane diffusion model*), que es independiente de la agregación de los péptidos, un proceso desfavorecido desde el punto de vista entrópico y electrostático (Bechinger, 1997). El modelo postula que la inserción de los péptidos en el plano de las bicapas produce alteraciones del empaquetamiento lipídico y una reducción del grosor medio de la membrana. La difusión del péptido en el plano y el solapamiento de regiones de inestabilidad, junto con las alteraciones del empaquetamiento lipídico, conduce a la formación de aberturas transitorias en la membrana (Fig. 2.9D) (Bechinger, 1999).

Los datos experimentales sugieren que la formación de canales y poros y la rotura global de la membrana podrían representar una graduación continua en el mecanismo de acción en lugar de tres modos de acción completamente distintos (Dathe y Wieprecht, 1999). Además, el predominio de un mecanismo de permeabilización podría depender de factores tales como la proporción lípido:péptido, la composición de fosfolípidos de la membrana, la presencia de ciertos iones, u otros parámetros (Bechinger, 1999; Dathe y Wieprecht, 1999).

### **II.5.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PROCARIÓTICOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL: LAS BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS**

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas actúan generalmente mediante un mecanismo de acción consistente en la desestabilización funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles (Montville y Bruno, 1994; Abee, 1995; Moll *et al.*, 1999a). En general, estos péptidos se unen a las membranas de dichas células, se insertan en la bicapa lipídica y alteran su permeabilidad mediante la formación de poros de especificidad variable. En la actualidad, este mecanismo no se conoce con precisión y continúa siendo objeto de investigación (Montville y Chen, 1998). A

continuación se exponen los modelos propuestos para explicar el mecanismo molecular de acción de la nisina, como paradigma de los lantibióticos, y de algunas bacteriocinas de la clase II.

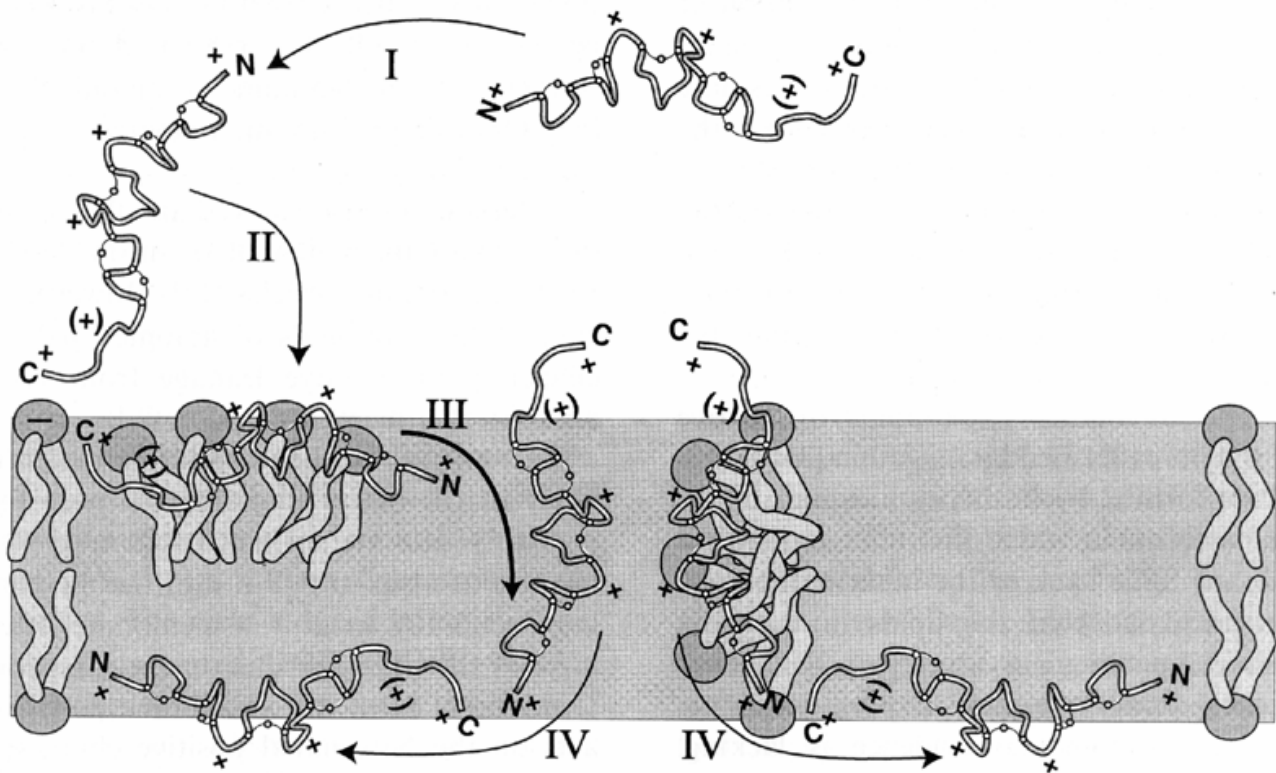
### II.5.2.1. Nisina

Dentro del grupo de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, el mecanismo de acción estudiado en mayor profundidad hasta la fecha es probablemente el de la nisina. Se trata de una molécula de naturaleza catiónica y anfifílica, con una región N-terminal hidrofóbica y una región C-terminal hidrofílica que contiene la mayoría de los aminoácidos cargados. (van de Ven, 1991; van de Hooven, 1996; Breukink y de Kruiffj, 1999). La nisina, a través de su región C-terminal, interacciona preferentemente con membranas compuestas por fosfolípidos aniónicos (Driessen *et al.*, 1995a; Breukink *et al.*, 1997), causando un aumento transitorio de la permeabilidad a iones de pequeño tamaño y a otros solutos (Gao *et al.*, 1991; Bruno *et al.*, 1992; Okereke y Montville, 1992; Winkowski *et al.*, 1996; Sahl y Bierbaum, 1998). La permeabilización de la membrana por la nisina está estimulada tanto por el  $\Delta\Psi$  (negativo en el interior) (Driessen *et al.*, 1995a) como por el  $\Delta\text{pH}$  (alcalino en el interior) (Moll *et al.*, 1997). Si bien la molécula adopta inicialmente una orientación paralela a la membrana, con el extremo N-terminal insertado más profundamente que el C-terminal (Breukink *et al.*, 1998), el extremo C-terminal (Martin *et al.*, 1996; Winkowski *et al.*, 1996) o incluso la molécula entera (van Kraaij *et al.*, 1998) puede penetrar en el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica e intervenir en la formación de los poros. Estas dos observaciones, en principio contradictorias, pueden compatibilizarse mediante el modelo de cuña (del inglés *Wedge Model*) (Driessen *et al.*, 1995a; Moll *et al.*, 1997; Breukink *et al.*, 1999) (Fig. 2.10), que presenta similitudes con el modelo toroidal propuesto para la magainina (sección II.5.1.3.2).

Según el modelo de cuña (Fig. 2.10), la nisina interacciona electrostáticamente mediante su extremo C-terminal con los fosfolípidos aniónicos de la membrana (I) y adopta inicialmente una orientación paralela a la superficie de la membrana (II); a continuación, la presencia de fosfolípidos aniónicos, de un  $\Delta\Psi$  negativo en el interior y/o de un  $\Delta\text{pH}$  alcalino en el interior, favorece la inserción de la nisina en la bicapa lipídica (III); a este respecto, conviene mencionar que, puesto que la inserción de los monómeros del péptido en la bicapa lipídica es un proceso energéticamente desfavorable, es posible que se produzca su agregación en la superficie de la membrana antes de su inserción; por otra parte, la participación de los fosfolípidos como miembros activos del poro no se ha determinado con precisión. Los poros formados por la nisina son de naturaleza inespecífica y

transitoria, y debido a la alta concentración de bacteriocina en la superficie externa de la bicapa, la relajación del poro produce el movimiento del péptido hacia la monocapa interna (IV) (Breukink *et al.*, 1999). En este sentido, se ha observado que la nisina induce el movimiento rápido de fosfolípidos (*flip-flop*) desde la monocapa interna a la externa en vesículas unilamelares de fosfolípidos (Moll *et al.*, 1998a).

El hecho de que la nisina ejerza en células completas una actividad antimicrobiana mayor que en sistemas de membrana modelo se ha explicado recientemente por la presencia del lípido II, un precursor de la síntesis de peptidoglicano unido a la membrana celular que podría actuar como molécula *docking*, es decir, facilitando la interacción de la nisina con la membrana de las células sensibles (Brötz *et al.*, 1998).



**Fig. 2.10. Modelo de cuña del mecanismo de acción de la nisina.** Los detalles del modelo se explican en el texto. Fuente: Breukink *et al.* (1999).



### II.5.2.2. Bacteriocinas de la clase II

La capacidad de las bacteriocinas para adoptar conformaciones anfipáticas en hélice  $\alpha$  o en lámina  $\beta$  es uno de los factores determinantes para su interacción con las membranas y para la formación de poros. La primera estructura tridimensional de una bacteriocina de la clase II que se determinó fue la de la leucocina A, obtenida mediante resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) (Gallagher, 1997). Posteriormente, Chen *et al.* (1997a) predijeron la estructura tridimensional de la pediocina PA-1, y, recientemente, se ha obtenido por NMR la de la carnobacteriocina B2, una bacteriocina con una identidad de secuencia del 66% con la leucocina A (Wang *et al.*, 1999). La pediocina PA-1 y la leucocina A tienen en común la presencia en su región N-terminal de una conformación  $\beta$  en triple lámina plegada estabilizada por un puente disulfuro; sin embargo, la carnobacteriocina B2 carece de estructura secundaria en esta región. En lo que se refiere a la región C-terminal, la leucocina A y la carnobacteriocina B2 adoptan una conformación en hélice  $\alpha$  anfipática entre los residuos 17-31 y 19-39, respectivamente, mientras que la estructura de esta región no se pudo predecir en el caso de la pediocina PA-1. Las estructuras tridimensionales de los péptidos están claramente relacionadas con su actividad biológica. Así, la estructura tridimensional de la pediocina PA-1 predice la existencia de dos regiones con carga positiva (Lys<sup>11</sup>-His<sup>12</sup> y Lys<sup>20</sup>-His<sup>42</sup>-Lys<sup>43</sup>), que refuerza la hipótesis de que el proceso de unión inicial a las membranas de las células sensibles está gobernado por interacciones electrostáticas (Chen *et al.*, 1997b), y de una región hidrofóbica (Val<sup>7</sup>-Cys<sup>9</sup>-Cys<sup>14</sup>-Val<sup>16</sup>-Trp<sup>18</sup>), que podría dirigir la inserción de la molécula en la membrana (Chen *et al.*, 1997a). Asimismo, las hélices  $\alpha$  anfipáticas de la leucocina A y de la carnobacteriocina B2 podrían interaccionar con la membrana bacteriana para ejercer su actividad antimicrobiana (Gallagher *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999).

A pesar de la similitud de las estructuras primarias de las bacteriocinas de la familia de la pediocina, su espectro antimicrobiano presenta diferencias considerables (Fimland *et al.*, 1996; Gallagher *et al.*, 1997). La mayor variabilidad y anfipaticidad (o hidrofobicidad) del extremo C-terminal de las bacteriocinas de la clase II, sugiere que esta región es la responsable del reconocimiento de las células sensibles y de la interacción de la bacteriocina con la región hidrofóbica de la membrana (Fimland *et al.*, 1998). En este sentido, mientras que la región N-terminal, conservada en las bacteriocinas de la clase IIa (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Aymerich *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000), podría encargarse de la unión inespecífica de las

bacteriocinas a las células diana mediante interacciones electrostáticas (Chen *et al.*, 1997a; Chen *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 1998), la C-terminal lo haría del reconocimiento de las células sensibles, tal y como se ha demostrado al determinar la especificidad de bacteriocinas híbridas de la clase IIa (Fimland *et al.*, 1996). Por lo tanto, la región C-terminal debe interaccionar con alguna entidad de la membrana de las células diana, que puede ser un sitio de unión en la superficie celular que posibilite el acúmulo del número de moléculas necesario para permeabilizar la membrana, o bien, un componente de la membrana. Dicha interacción puede ser quiral, con la intervención de un receptor proteico, como se ha propuesto en la lactostrepcina 5 (Zajdel *et al.*, 1985), la lactococcina A (Van Belkum *et al.*, 1991b), la pediocina PA-1 (Chikindas *et al.*, 1993) y la leucocina A (Gallagher *et al.*, 1997), o bien, no quiral, como la establecida entre las cadenas laterales de las bacteriocinas y los lípidos de la membrana o ciertos componentes de la pared celular (Maftah *et al.*, 1993; Moll *et al.*, 1996; Fimland *et al.*, 1998; Hauge *et al.*, 1998).

La existencia de un receptor proteico específico es una cuestión controvertida. Por una parte, puesto que no todas las células son sensibles a todas las bacteriocinas, debe existir alguna característica que determine su especificidad, ya sean moléculas de la superficie celular, como los ácidos lipoteicoicos (Zadjel *et al.*, 1985; Fleury *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1996; Hauge *et al.*, 1998a), una composición de fosfolípidos y/o una organización proteica determinadas (Maftah *et al.*, 1993; Bennik *et al.*, 1997b), o verdaderos receptores proteicos que medien un proceso de reconocimiento molecular específico (Gallagher, 1997). Por otra parte, la existencia de bacteriocinas de la clase II capaces de actuar en sistemas liposomales, como la termofilina 13 (Marciset *et al.*, 1997) y la pediocina PA-1 (Chen *et al.*, 1997a) ponen en duda la necesidad absoluta de un receptor proteico o de determinados componentes de la superficie celular para la actividad de las bacteriocinas de la clase II.

Tras la fase inicial de unión, las bacteriocinas de la clase II pueden adoptar su conformación bioactiva en el ambiente de la membrana (Gallagher *et al.*, 1997; Hauge *et al.*, 1999), insertarse en ésta y, por último, alterar su permeabilidad debido a la formación de poros, probablemente mediante un mecanismo en “duela de barril” (sección II.5.1.3.1) (Moll *et al.*, 1999a). Alternativamente, se ha propuesto el modelo de “alfombra” (sección II.5.1.3.3), para explicar la selectividad que algunos poros presentan por los cationes.

La Tabla II.7 muestra el efecto de una serie de bacteriocinas de la clase II en el estado energético y metabólico de las células sensibles. En general, la formación de poros en la membrana plasmática produce una pérdida de la permeabilidad celular selectiva y conduce a la disipación de uno o ambos de los componentes de la PMF, alterándose en consecuencia numerosos procesos de

transporte que dependen de este gradiente electroquímico. La disipación de determinados gradientes iónicos causa a su vez la disminución del ATP intracelular, que se hidroliza en un intento vano de reestablecerlos. Asimismo, la entrada al citoplasma de  $\text{Na}^+$ , que causa un grave desequilibrio osmótico, y/o de  $\text{H}^+$ , que disminuyen el pH intracelular e inhiben numerosos procesos enzimáticos, podría intervenir en la inhibición del crecimiento producida por las bacteriocinas (Moll *et al.*, 1999a). El colapso del gradiente electroquímico de la membrana y, por lo tanto, la privación de la fuente de energía de la célula, conducen en última instancia a la muerte celular.

Tabla II.10. Mecanismo molecular de acción de las bacteriocinas de la clase II			
Bacteriocina	Productor	Mecanismo molecular de acción	Referencia(s)
Enterocina AS-48	<i>E. faecalis</i> S48	Alteración de niveles citoplasmáticos de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ y lisis celular Liberación de Rb y uridina de liposomas Disipación del $\Delta\Psi$ y del $\Delta\text{pH}$	Gálvez <i>et al.</i> (1991) Mendoza <i>et al.</i> (1999)
Lactococcina A	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Disipación del $\Delta\Psi$ Inhibición del transporte de aminoácidos Liberación de aminoácidos preacumulados Liberación de glutamato	Van Belkum <i>et al.</i> (1991b)
Lactococcina B	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	Disipación de la PMF ( $\Delta\Psi$ y $\Delta\text{pH}$ ) Liberación de glutamato <sup>a</sup> Liberación de AIB <sup>b</sup>	Venema <i>et al.</i> (1993)
Mesentericina Y105	<i>Lc. mesenteroides</i>	Disipación del $\Delta\Psi$ Inhibición de la captación de leucina y liberación de la misma Liberación de glutamato Inhibición de la ATP-sintetasa mitocondrial	Maftah <i>et al.</i> (1993)
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Disipación del $\Delta\Psi$ Inhibición del transporte de AIB y liberación del mismo Liberación de glutamato <sup>a</sup> Liberación de $\text{K}^+$ Liberación de fosfato Disminución del ATP intracelular	Chikindas <i>et al.</i> (1993) Chen y Montville (1995)
Lactacina F	<i>Lb. jhonsonii</i> VP11088	Despolarización de la membrana plasmática Liberación de $\text{K}^+$ Hidrólisis del ATP intracelular	Abee <i>et al.</i> (1994)

Tabla II.10. (cont.)			
Bacteriocina	Productor	Mecanismo molecular de acción	Referencia(s)
Lactococcina G	<i>L. lactis</i> LMG2081	Disipación selectiva del $\Delta\Psi$ Bloqueo del transporte de glutamato, sin liberación Disminución del ATP intracelular Inhibición del transporte de AIB y liberación del mismo Liberación de Rb <sup>86</sup> Permeabilización de la membrana a cationes monovalentes Incremento del $\Delta\text{pH}^c$	Moll <i>et al.</i> (1996)     Moll <i>et al.</i> (1998b)
Acidocina J1132	<i>Lb. acidophilus</i> JCM11132	Colapso del $\Delta\text{pH}$ y reducción significativa del $\Delta\Psi$ Inhibición del transporte de AIB y liberación del mismo Liberación de glutamato	Tahara <i>et al.</i> (1996)
Acidocina 8912	<i>Lb. acidophilus</i> TK8912	Colapso del $\Delta\text{pH}$ y reducción significativa del $\Delta\Psi$ Inhibición del transporte de AIB y salida al medio exocelular Liberación de glutamato	Tahara <i>et al.</i> (1996a)
Acidocina J1229	<i>Lb. acidophilus</i> JCM1229	Colapso del $\Delta\text{pH}$ y reducción significativa del $\Delta\Psi$ Inhibición del transporte de AIB y liberación del mismo Liberación de glutamato <sup>a</sup>	Tahara y Kanatani (1996)
Termofilina 13	<i>S. thermophilus</i> SF113	Disipación de la PMF en liposomas	Marciset <i>et al.</i> (1997)
Munditocina	<i>E. mundtii</i> ATO6	Disipación del $\Delta\Psi$ Disminución del ATP intracelular	Bennik <i>et al.</i> (1998)
Plantaricinas EF y JK	<i>Lb. plantarum</i> C11	Disipación de la PMF Conducción de cationes monovalentes (PIn EF) Conducción de aniones específicos (PIn JK)	Moll <i>et al.</i> (1999b)

<sup>a</sup>Las bacteriocinas lactococcina B, pediocina PA-1 y acidocina J1229 causan la liberación de glutamato de las células sensibles únicamente cuando se emplean a altas concentraciones; <sup>b</sup> AIB: ácido aminoisobutírico (análogo no metabolizable de la alanina); <sup>c</sup>El incremento del  $\Delta\text{pH}$  se observa únicamente en células que no han sido previamente tratadas con valinomicina.



### *CAPÍTULO III*

*CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE TRES CEPAS  
BACTERIOCINOGENICAS DE *E. faecium* AISLADAS DE  
EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS: CARACTERIZACIÓN  
BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE SUS BACTERIOCINAS*





### III.1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas desempeñan un papel muy importante en la producción de alimentos fermentados, a los que confieren características organolépticas deseables y/o un aumento de sus propiedades nutritivas (Gilliland, 1990); asimismo, la producción por estas bacterias de bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos incrementa la calidad higiosanitaria de los productos fermentados (Stiles, 1996; Ray y Daeschel, 1996). Las bacterias lácticas se aíslan de una gran variedad de sustratos alimenticios, incluyendo productos lácteos,



vegetales y cárnicos (Stiles y Holzapfel, 1997). Dentro de estos últimos, los chorizos elaborados artesanalmente constituyen una fuente adecuada de aislamiento de bacterias lácticas bacteriocinogénicas, como lo demuestra la identificación a partir de estos productos de cepas de los géneros *Lactobacillus* (Rodríguez, 1991; Sobrino, 1993; Cintas, 1995; Casaus, 1998), *Pediococcus* (Moreira, 1993; Cintas, 1995; Casaus, 1998), *Lactococcus* (Cintas, 1995; Rodríguez, 1995b; Casaus, 1998) y *Enterococcus* (Cintas, 1995; Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 1998b, 2000b) productoras de lactocina S, pediocina PA-1, nisina A y diversas enterocinas, como la enterocina A, enterocina B, enterocina P, enterocinas L50 y enterocina Q, respectivamente.

En este capítulo se describe la caracterización bioquímica y genética de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21, aisladas de chorizos artesanos elaborados en distintas localidades de España durante un trabajo experimental previo (Casaus, 1998). En la fase inicial de su caracterización, se evaluó el espectro antimicrobiano de los sobrenadantes de dichas cepas y se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana para determinar su inmunidad cruzada con otras productoras de bacteriocinas ya conocidas. A continuación, las sustancias antimicrobianas de las tres cepas se purificaron a homogeneidad y las fracciones cromatográficas finales con actividad antimicrobiana se sometieron a secuenciación aminoacídica. Finalmente, se contrastó la identidad bioquímica de las bacteriocinas mediante PCR y secuenciación nucleotídica y se determinó la organización genética de los operones correspondientes.

## III.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### III.2.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGENICAS DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS ESPAÑOLES

Las cepas de bacterias lácticas AA13, G16 y P21 se aislaron de embutidos crudos curados (chorizos caseros) procedentes de diferentes localidades españolas durante la Tesis Doctoral realizada por Pilar Casaus en el Departamento de Nutrición y Bromatología III de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (Casaus, 1998). La confirmación de la especie de estas cepas y su filiación taxonómica fueron realizadas, mediante el análisis del patrón electroforético de sus proteínas totales en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) por el Dr. Bruno Pot (Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Bioquímica, Fisiología y Microbiología de la Universidad de Gante, Bélgica). Mediante dicho análisis, las cepas AA13 y G16 se identificaron como *E. faecium*-atípico y la cepa P21 como *E. faecium* (Casaus, 1998).

### III.2.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS INDICADORES

#### III.2.2.1. Obtención de sobrenadantes libres de células

Los microorganismos productores de sustancias antimicrobianas *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se inocularon en caldo nutritivo MRS suministrado por Oxoid (Basingstoke, Reino Unido) y se incubaron a 32°C durante 16 h en condiciones de aerobiosis. Los sobrenadantes libres de células se obtuvieron por centrifugación de los cultivos a 8.000 rpm y 4°C durante 10 min. A continuación, se ajustó el pH de los sobrenadantes a 6,2 y, posteriormente, se esterilizaron con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Acrodisc, PF, Gelman Sciences, Ann Harbor, Michigan, EE.UU.). Estas fracciones se denominarán, en lo sucesivo, sobrenadantes.

#### III.2.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se empleó una modificación del método de difusión en agar descrito por Cintas *et al.* (1995). Para ello, se prepararon placas con distintos medios de cultivo y con agar

sólido (1,5%, p/v) que contenían los microorganismos indicadores a una concentración final aproximada de  $1 \times 10^5$  ufc/ml. Una vez solidificado el agar, las placas se secaron en una estufa termostataada a 37°C durante 1 h. A continuación, se excavaron en el agar, con ayuda de un “sacabocados”, pocillos de 7 mm de diámetro en los que se depositaron 100 µl de los sobrenadantes a evaluar. Las placas se preincubaron a 4°C durante 2 h para favorecer la difusión de las sustancias antimicrobianas y, posteriormente, se incubaron durante 24-48 h en las condiciones adecuadas para cada indicador. Una vez finalizada la incubación, la actividad antimicrobiana se cuantificó midiendo con un calibre el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador.

Las cepas bacterianas empleadas como microorganismos indicadores, su origen y las condiciones empleadas para su cultivo se muestran en la Tabla III.1.

### **III.2.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR CRUZADA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS E INMUNIDAD A SUS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES**

La inmunidad de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 a su propia actividad antimicrobiana, así como la resistencia o sensibilidad que dichas cepas presentaban entre sí y frente a *E. faecium* P13, productora de la enterocina P (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998), y *E. faecium* T136, productora de las enterocinas A y B (Casaus *et al.*, 1997; Casaus, 1998), se determinó mediante el método de difusión en agar descrito en la sección anterior. Para ello, se obtuvieron los sobrenadantes de las cepas y se determinó su actividad inhibidora empleando como microorganismos indicadores las cepas bacterianas citadas.

### **III.2.4. ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES PRODUCIDAS POR *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

La estabilidad físico-química de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se determinó empleando sobrenadantes obtenidos como se describió en la sección III.2.2.1.

**Tabla III.1. Microorganismos indicadores utilizados en este trabajo**

Microorganismo indicador	Cepa	Origen <sup>a</sup>	Condiciones de incubación	
			Medio	Temperatura (°C)
<i>Lb. casei</i>	334	ATCC	MRS	32
<i>Lb. fermentum</i>	285	CECT	MRS	32
<i>Lb. plantarum</i>	1193	NCDO	MRS	32
<i>Lb. sakei</i>	2714	NCFB	MRS	32
<i>Lb. sakei</i>	148	Sobrinio (1993)	MRS	32
<i>L. lactis</i>	BB24	Cintas (1995)	MRS	32
<i>L. lactis</i>	CNRZ117	INRA	MRS	32
<i>P. acidilactici</i>	347	Moreira (1993)	MRS	32
<i>P. pentosaceus</i>	FBB61	TNO	MRS	32
<i>P. pentosaceus</i>	FBB63	TNO	MRS	32
<i>P. pentosaceus</i>	PC1	TNO	MRS	32
<i>E. faecium</i>	L50	Cintas (1995)	MRS	32
<i>E. faecium</i>	P13	Casaus (1998)	MRS	32
<i>E. faecium</i>	T136	Casaus (1998)	MRS	32
<i>E. faecium</i>	AA13	Casaus (1998)	MRS	32
<i>E. faecium</i>	G16	Casaus (1998)	MRS	32
<i>E. faecium</i>	P21	Casaus (1998)	MRS	32
<i>E. faecalis</i>	EF	TNO	MRS	32
<i>Prop. acidipropionici</i>	P4	TNO	APT	32
<i>Ls. monocytogenes</i>	7973	NCTC	APT	37
<i>Ls. monocytogenes</i>	LI5sv1/2	FVM	APT	37
<i>Ls. monocytogenes</i>	5105	NCTC	APT	37
<i>Ls. monocytogenes</i>	LI1sv4	FVM	APT	37
<i>Ls. monocytogenes</i>	Scott A	FVM	APT	37
<i>St. aureus</i>	137	FRI	APT	37
<i>St. aureus</i>	196E	FRI	APT	37
<i>St. aureus</i>	349	FRI	APT	37
<i>St. aureus</i>	361	FRI	APT	37
<i>Cl. perfringens</i>	376	CECT	RCM	37 (A)
<i>Cl. botulinum</i>	551	CECT	RCM	37 (A)

<sup>a</sup>Abreviaturas: ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, EE.UU.); CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España); INRA, Station de Recherches Laitières (Jouy-en-Josas Cedex, Francia); FRI, Food Research Institute (Madison, Wisconsin, EE.UU.); FVM, Facultad de Veterinaria de Madrid (Madrid, España); NCDO y NCFB, National Collection of Dairy Organisms (Reading, Reino Unido); NCTC, National Collection of Type Cultures (Londres, Reino Unido); TNO, Nutrition and Food Research (Zeist, Holanda); MRS, caldo de Man, Rogosa y Sharpe (Oxoid); APT, caldo *All Purpose Tween* (Difco Lab., Detroit, Michigan, EE.UU.); RCM, *Reinforced Clostridial Medium* (Oxoid); (A): incubación bajo condiciones de anaerobiosis. Las abreviaturas de los géneros bacterianos se muestran en el Apéndice 1.

#### III.2.4.1. Efecto de enzimas proteolíticos, glucolíticos y lipolíticos

La sensibilidad de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 a diversos enzimas se determinó mediante el tratamiento de los sobrenadantes correspondientes con enzimas proteolíticos (papaína, pepsina, tripsina y proteasa II), glucolíticos ( $\alpha$ -amilasa) y lipolíticos (lipasa I) a una concentración final de 1 mg/ml. Paralelamente, se prepararon controles consistentes en sobrenadantes resuspendidos en tampón sin enzima (control positivo) o en el enzima resuspendido en su tampón correspondiente (control negativo). Los tubos se incubaron a 32°C durante 24 h, tras lo que se calentaron a 100°C durante 10 min para, en su caso, inactivar los enzimas, e inmediatamente se sumergieron en hielo.

#### III.2.4.2. Efecto del pH

Para determinar el efecto del pH en la estabilidad de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se emplearon alícuotas de sobrenadantes liofilizados que se resuspendieron en caldo MRS con el pH ajustado a valores desde 2 a 11. A continuación, cada una de las muestras se dividió en dos nuevas alícuotas, que se incubaron a 4 y 32°C durante 24 h. Como control se emplearon alícuotas de los sobrenadantes que se mantuvieron a -20°C.

#### III.2.4.3. Efecto de la temperatura

La estabilidad térmica de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se determinó empleando sobrenadantes concentrados diez veces por liofilización que se resuspendieron en MRS con el pH ajustado a 4,7. Los sobrenadantes se trataron en un termobloque de calor seco a 80 y 100°C y se tomaron muestras a los 10 y 20 min. Como control se emplearon alícuotas de las muestras que se mantuvieron sumergidas en hielo.

#### **III.2.4.4. Cuantificación de la actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras**

Una vez efectuados los tratamientos físico-químicos descritos, la actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se determinó mediante un ensayo de actividad antimicrobiana en placas microtituladoras (Holo *et al.*, 1991). Los microorganismos empleados como indicadores fueron *E. faecium* T136, para la evaluación de la actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, y *E. faecium* P13, para la de los sobrenadantes de *E. faecium* P21. El ensayo de actividad antimicrobiana se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos del siguiente modo: en la primera fila de pocillos se depositaron 100 µl de las fracciones a analizar y, a partir de ellas, se realizaron diluciones seriadas (1/2, 1/4, 1/8, etc.) en caldo MRS; a continuación se añadieron a cada pocillo 150 µl del microorganismo indicador ( $2,5 \times 10^6$  ufc/ml) y se incubaron las placas a 32°C durante 14 h. Finalizada la incubación, se determinó el crecimiento del microorganismo indicador (densidad óptica del cultivo a 620 nm, o DO<sub>620</sub>) empleando un lector de placas microtituladoras (Labsystems iEMS reader, Labsystems, Helsinki, Finlandia) y se expresó la actividad antimicrobiana en unidades de bacteriocina por ml (UB/ml). Una unidad de bacteriocina (UB) se define como el recíproco de la dilución que inhibe en un 50% el crecimiento del microorganismo indicador (50% de la DO<sub>620</sub> de un cultivo control del microorganismo indicador sin bacteriocina).

#### **III.2.5. EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MRS, BHI Y APT PARA LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

Para determinar el efecto del medio de cultivo en la producción y/o detección de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se inocularon tubos de caldo MRS (Oxoid), APT (*All Purpose Tween*, Difco Lab., Detroit, EE.UU.) y BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid) con aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml de cada una de las cepas y se incubaron a 32°C durante 16 h. Finalizada la incubación, se obtuvieron los sobrenadantes y se determinó su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar (sección II.2.2.2) utilizando como microorganismos indicadores los citados en la sección anterior.

### III.2.6. CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 EN CALDO MRS

Para la obtención de las curvas de crecimiento y de producción/detección de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se inocularon tubos de caldo MRS con aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml de cada una de las cepas y se incubaron a 32°C. A intervalos de 2 h se tomaron muestras para determinar su DO<sub>620</sub>, su pH y el número de microorganismos viables mediante recuentos en placas. Paralelamente, se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes de los cultivos para determinar su actividad inhibidora mediante el método de difusión en agar (sección II.2.2.2), empleando como microorganismos indicadores las cepas citadas en la sección II.2.4.

### III.2.7. PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD DE LAS BACTERIOCINAS DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21. DETERMINACIÓN DE SU SECUENCIA AMINOACÍDICA

Las bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se purificaron a partir de 1 l de cultivo en fase estacionaria empleando una modificación de los procedimientos descritos por Nissen-Meyer *et al.* (1992a) y Cintas *et al.* (1995, 1998a). Estos procedimientos se basan en el empleo de técnicas cromatográficas que separan las moléculas en función de sus diferentes propiedades físico-químicas, como, por ejemplo, su tamaño molecular, su carga electrostática neta y su hidrofobicidad.

#### III.2.7.1. Protocolo de purificación

Todas las etapas del proceso de purificación se realizaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario. Durante el proceso de purificación se recogieron alícuotas de las distintas fracciones y se conservaron a 4°C para determinar posteriormente su absorbancia a 280, 254 y 214 nm y su actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.2.4.), empleando como microorganismos indicadores *E. faecium* T136, en el caso de la purificación de las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, y *E. faecium* P13, en el caso de la purificación de las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* P21. Con los resultados obtenidos se elaboraron las tablas de purificación correspondientes, en las que, entre

otros datos, se muestran el rendimiento del proceso de purificación y el incremento de la actividad antimicrobiana específica.

El procedimiento de purificación empleado se describe a continuación:

- 1) A partir de cultivos de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 desarrollados en caldo MRS a 32°C durante 16 h se inocularon 100 µl (0,01%, v/v) en botellas que contenían 1 l de caldo MRS (Oxoid) y se incubaron a 32°C hasta que los cultivos alcanzaron el inicio de la fase estacionaria de su desarrollo ( $DO_{620} \approx 0,9$ ).
- 2) Los cultivos se centrifugaron a 8.000 rpm y 4°C durante 20 min para obtener los sobrenadantes libres de células (fracción I).
- 3) A continuación, se añadieron gradualmente y en agitación 400 g de sulfato amónico por litro de sobrenadante. Posteriormente, la muestra se mantuvo a 4°C en agitación durante 2 h. Finalizado este tiempo, se centrifugó a 8.000 rpm y 4°C durante 20 min. El precipitado y el material flotante obtenidos se resuspendieron en 100 ml de tampón fosfato sódico 20 mM (en adelante, tampón NaP) de pH 5,8 (fracción II).
- 4) La fracción II se desaló mediante cromatografía de filtración en gel empleando minicolumnas de polipropileno (mod. PD10, Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia) preempaquetadas con 1 ml de gel Sephadex G-25 (Pharmacia LKB). Para ello se depositaron 2 ml de la fracción II en cada columna y, posteriormente, el gel se lavó con 4 ml de tampón NaP, pH 5,8. Antes de aplicar la siguiente alícuota de la fracción II se eliminaron las sales retenidas en las minicolumnas añadiendo 5 ml de agua desionizada. Todas las fracciones de 4 ml “eluidas” de cada minicolumna se mezclaron y juntas constituyeron la fracción III (200 ml).
- 5) Posteriormente, la fracción III se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico empleando columnas de 2,5 × 30 cm (mod. Econo Column, Bio-Rad, California, EE.UU.) que contenían aproximadamente 15 ml de la matriz cromatográfica SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia-LKB). La matriz cromatográfica se equilibró con 50 ml de tampón NaP, pH 5,8, y, a continuación, la fracción III se depositó lentamente con una pipeta Pasteur. Tras el lavado de la columna con 50 ml de tampón NaP, pH 5,8, los compuestos retenidos se eluyeron con 50 ml de una solución 1 M de NaCl en tampón NaP, pH 5,8, obteniéndose la fracción IV.
- 6) Seguidamente, se realizó una cromatografía de interacción hidrofóbica empleando columnas de 1,5 × 20 cm (mod. Econo Column, Bio-Rad) que contenían como matriz cromatográfica 2 ml del gel Octyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia-LKB). El gel se equilibró con una solución de sulfato amónico (10%, p/v) en tampón NaP, pH 5,8. A la fracción IV también se le añadió



sulfato amónico a una concentración final del 10% (p/v) y se depositó lentamente en la columna con una pipeta Pasteur. La columna se lavó con 15 ml del tampón de equilibrado y las sustancias retenidas se eluyeron en una solución de alcohol etílico (50% v/v) en tampón NaP, pH 5,8, obteniéndose la fracción V.

- 7) A la muestra a cromatografiar se le añadió ácido trifluoroacético (TFA) (0,1%, v/v) y se diluyó hasta un volumen de 50 ml con una solución de TFA (0,1%, v/v) en agua desionizada (solución A). A continuación, la muestra se cargó con una bomba peristáltica (mod. PD-1, Pharmacia-LKB) en un *superloop* de 50 ml integrado en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*) (Pharmacia-LKB). La columna de fase inversa PepRPC HR5/5 (Pharmacia LKB) se instaló en el equipo de FPLC y se equilibró con la solución A. Seguidamente, la muestra a cromatografiar se inyectó automáticamente a un flujo de 1 ml/min y la columna se lavó con la solución A hasta que la absorbancia a 254 nm ( $A_{254}$ ), detectada por un monitor de luz ultravioleta mod. UV-M-II y registrada por una impresora mod. REC-2 (ambos de Pharmacia- LKB), alcanzó la línea basal. La muestra retenida en la columna se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 100 de TFA (0,1%, v/v) en isopropanol (solución B) a un flujo de 0,5 ml/min, las muestras eluidas se recogieron en tubos independientes en función de su  $A_{254}$  y se determinó su actividad antimicrobiana mediante el ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.2.4). Las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana se mezclaron y diluyeron con solución A hasta un volumen de 10 ml, recromatografiándose nuevamente bajo condiciones similares a las descritas anteriormente. Este proceso se repitió hasta obtener fracciones con actividad antimicrobiana y cromatográficamente puras. A estas fracciones cromatográficas finales se les añadió isopropanol hasta una concentración final del 60% (v/v) y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo.

### III.2.7.2. Determinación de la secuencia aminoacídica de las bacteriocinas

Las fracciones que contenían las bacteriocinas purificadas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se desecaron a vacío en un rotavapor y se enviaron al Dr. Jesús Vázquez (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid) para la determinación de su secuencia aminoacídica. La secuenciación mediante degradación de Edman se realizó en un secuenciador de proteínas mod. ABI473A (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, EE.UU.)

conectado a un analizador automático de derivados feniltiohidantoína-aminoácido por el sistema de cromatografía rápida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*).

### **III.2.8. AISLAMIENTO Y VISUALIZACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO Y CROMOSÓMICO DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

#### **III.2.8.1. Aislamiento del DNA plasmídico y cromosómico**

El aislamiento del DNA plasmídico y cromosómico se realizó mediante la técnica de aislamiento de plásmidos de gran tamaño de “estreptococos lácticos” descrita por Anderson y McKay (1983), con las modificaciones introducidas por Casaus (1998). En una primera fase, las células bacterianas se tratan con EDTA, agente quelante de cationes que desestabiliza la membrana externa e inhibe las DNasas, y con lisozima, enzima que debilita la pared celular bacteriana. Más tarde, se adiciona el detergente SDS, que solubiliza los fosfolípidos y proteínas de la membrana y causa la lisis de las células y la liberación de su contenido al medio extracelular. A continuación, se añade NaOH, que desnatura el DNA cromosómico y las proteínas, pero no el DNA plasmídico covalentemente cerrado. Posteriormente, el lisado se neutraliza con una solución ácida en presencia de una alta concentración de NaCl, lo que provoca que el DNA cromosómico se renaturalice y agregue formando una red insoluble. Simultáneamente, la elevada concentración de NaCl ocasiona la precipitación de los complejos de SDS-proteínas y del RNA de elevado peso molecular. Asumiendo que el pH de la desnaturalización alcalina se ha controlado cuidadosamente, las moléculas de DNA plasmídico circular covalentemente cerrado permanecerán en solución, mientras que las macromoléculas contaminantes coprecipitarán. Finalizado el tratamiento, el precipitado se elimina por centrifugación y los plásmidos se precipitan con etanol. A continuación, se detalla el protocolo empleado:

- 1) Las cepas a analizar se cultivaron en 10 ml de caldo MRS a 32°C hasta alcanzar el final de la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{620} \approx 0,7$ ). Las células se obtuvieron por centrifugación a 12.000 rpm y 4°C durante 10 min y se lavaron con 1 ml de solución de NaCl (0,9%, p/v) (solución salina) y, posteriormente, con 1 ml de una solución de sacarosa (7,7%, p/v), Tris Base anhidro 50 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0 (tampón STE).
- 2) El sedimento se resuspendió en 380 µl del tampón STE y 96 µl de solución de lisozima (5 mg/ml en una solución de Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0 y glucosa 50 mM [tampón

TED)) y, tras agitar energicamente, se mantuvo en un baño termostatado a 37°C durante 30 min.

- 3) A la mezcla anterior se le añadieron 48 µl de una solución de Tris-HCl 50 mM y EDTA 250 mM, pH 8,0 (tampón ET) y 28 µl de una solución de SDS (20%, p/v), Tris-HCl 50 mM y EDTA 20mM, pH 8,0 (tampón de SDS al 20%), mezclando inmediatamente con suavidad. A continuación, la muestra se incubó en un baño termostatado a 37°C durante 5 min.
- 4) A la muestra lisada se le añadieron 28 µl de una solución de NaOH 3M recién preparada y se mantuvo en un agitador orbital a 250 rpm durante 10 min. A continuación, se añadieron 50 µl de Tris-HCl 2M, pH 7,0, y se agitó nuevamente durante 3 min, tras lo que se le añadieron 72 µl de NaCl 5M.
- 5) A la mezcla anterior se le añadió el mismo volumen de una solución de fenol-Tris HCl 2M, pH 7,5 (1:1) (con 0,1% de hidroxiquinolina como antioxidante y colorante) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Tras la centrifugación, la fase superior acuosa y transparente se trasvasó a un nuevo tubo de Eppendorf y se le añadió el mismo volumen de una solución de fenol-Tris-cloroformo-isoamílico (25:24:1), centrifugándose a continuación a 12.000 rpm durante 5 min. La fase superior se trasvasó nuevamente a un tubo de Eppendorf y se le añadió el mismo volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), centrifugándose a continuación a 12.000 rpm durante 5 min.
- 6) Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se le añadieron 2-3 volúmenes de etanol preenfriado a -20°C. Las muestras se mantuvieron a -80°C durante 1 h para precipitar el DNA plasmídico y, posteriormente, se centrifugaron a 13.000 rpm y 4°C durante 30 min.
- 7) A continuación, se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 ml de etanol (70%, v/v) en agua desionizada, tras lo cual se desecó a vacío en un rotavapor durante 5-10 min.
- 8) El sedimento desecado se resuspendió en 20-30 µl de una solución de RNasa (1 mg/ml) en tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 7,5) (tampón TER). La muestra se conservó a -20°C hasta su empleo.

Para el aislamiento del DNA cromosómico se procede de igual modo, con la excepción de las adiciones de NaOH 3M y NaCl 5M. El cloruro sódico se añade simultáneamente con los 2-3 volúmenes de etanol preenfriado. El sedimento final se resuspende en 50-100 µl de tampón TER.

### III.2.8.2. Visualización del DNA plasmídico y cromosómico

La visualización del DNA plasmídico y cromosómico se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) con 0,3 mg/ml de bromuro de etidio, agente que se intercala entre las bases del DNA y que emite una fluorescencia anaranjada cuando se ilumina con luz ultravioleta. Las muestras a visualizar se mezclaron con la solución de transporte 10× [50% (v/v) glicerol, 0,25% (p/v) azul de bromofenol y 2,5% (v/v) de solución TAE 40×, pH 7,2 (Tris-acetato 1,6 M, EDTA 40mM) en agua desionizada] y se cargaron en los pocillos del gel. Los patrones de tamaño molecular conocidos empleados en las electroforesis del DNA cromosómico fueron el “1-kb DNA ladder” y el “pBR322 DNA-*Msp*I Digest”, suministrados por Gibco-BRL (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y New England Biolabs (Beverly, EE.UU.), respectivamente; en las electroforesis de DNA plasmídico se empleó el “Supercoiled DNA ladder”, de Gibco-BRL. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 1 h y 15 min. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV en una cámara oscura y se fotografiaron con una cámara instantánea “Polaroid”, empleando una película en blanco y negro y un filtro para ultravioleta.

### III.2.9. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* AA13 Y *E. faecium* G16 Y DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE *E. faecium* P21. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) permite obtener un gran número de copias de una secuencia de DNA determinada mediante el empleo de dos oligonucleótidos, o cebadores, que flanquean la región de DNA que se pretende amplificar. La amplificación de DNA mediante PCR es una técnica muy versátil que, en combinación con la secuenciación nucleotídica, constituye una herramienta muy útil para la detección y el análisis de genes de interés en un determinado organismo.

En el presente trabajo experimental se emplearon tres modalidades de la técnica de PCR:

- 1) PCR específico: los dos cebadores empleados son complementarios del fragmento de DNA que contiene la secuencia nucleotídica a amplificar.

- 2) PCR hemiespecífico: uno de los cebadores utilizados en la amplificación es complementario al fragmento de DNA con la secuencia a amplificar, mientras que el otro es complementario a una secuencia del vector en el que se han insertado los fragmentos de restricción del DNA molde.
- 3) PCR anidado (del inglés *nested PCR*): emplea como DNA molde el producto de PCR de una reacción específica o hemiespecífica y, como cebadores, una pareja de oligonucleótidos en posición interna con respecto a los utilizados en la amplificación previa.

### III.2.9.1. Oligonucleótidos sintéticos o cebadores

Los cebadores empleados en el presente trabajo experimental para la amplificación y secuenciación del DNA de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se muestran en la Tabla III.2.

### III.2.9.2. Reacciones de amplificación del DNA mediante PCR específico

Las reacciones de amplificación (100  $\mu$ l) se realizaron en un termociclador de DNA (Perkin Elmer) empleando: (i) DNA molde (150-250 ng); (ii)  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  a una concentración final de 1,5 mM; (iii) una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs) (Pharmacia Biotech) a una concentración final de 0,8 mM; (iv) los cebadores (KEBOLab, Spanga, Suecia) a una concentración final de 0,7  $\mu$ M; y (v) 2,5 unidades de DNA polimerasa de *Thermus* sp. (*Taq*) y su correspondiente tampón 10 $\times$  (Advanced Biotechnologies, Surrey, Reino Unido).

Antes de comenzar la amplificación, las mezclas de reacción se sometieron a una temperatura de 97°C durante 2 min (*Hot Start*) para eliminar las estructuras secundarias del DNA que pudieran interferir en el proceso. Posteriormente, se adicionó el enzima y, finalmente, se añadieron dos gotas de aceite mineral. A continuación se iniciaron las reacciones de amplificación bajo las siguientes condiciones:

- (1) Etapa de desnaturalización: 94°C durante 1 min.
- (2) Etapa de hibridación: 60°C (cebadores LP6-LP7) y 55°C (cebadores TH10-LA1 y ENTB3-ENTB5) durante 30 s.
- (3) Etapa de polimerización: 72°C durante 30 s (cebadores LP6-LP7) y 45 s (cebadores TH10-LA1 y ENTB3-ENTB5). En cada reacción de amplificación se realizaron un total de 35 ciclos consecutivos.

**Tabla III.2. Oligonucleótidos sintéticos empleados en los experimentos de PCR y secuenciación nucleotídica**

Nombre	Empleo	Secuencia nucleotídica ( 5'-3' )	T <sub>m</sub> (°C)
<b>LP5</b> <b>(ENTP5)</b>	PCR <sub>N</sub> SEC	CTTTCAACAAAGTTCTAGAATTAAGTGAACAGC	60,5
<b>LP6</b>	PCR <sub>E,H</sub> SEC	GCTACGCGTTCATATGGTAATGGTG	60,6
<b>LP7</b>	PCR <sub>E,H</sub> SEC	ATGTCCCATACCTGCCAAACCAGAAGC	63,9
<b>TH10</b> <b>(ENTA1)</b>	PCR <sub>E,H</sub> SEC	GATTATGAAACATTATAAAAATTTTGTC	55,0
<b>LA1</b> <b>(ENTA2)</b>	PCR <sub>E</sub> SEC	AAAACCACCTATAGACATTCCTGC	57,0
<b>ENTB3</b>	PCR <sub>E</sub> SEC	AGACCTAACAACCTTATCTAAAG	50,7
<b>ENTB5</b> <b>(LB5)</b>	PCR <sub>E,H</sub> SEC	GTTGCATTTAGAGTATACATTTGC	53,6
<b>CH1(d)</b>	PCR <sub>H</sub> SEC	TAYGGIAAYGGIGTITYTG	47,7
<b>SK2</b>	PCR <sub>H,N</sub> SEC	CCGCTCTAGAACTAGTGGATC	54,2
<b>TH8</b>	PCR <sub>N</sub>	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	60,7
<p>Abreviaturas: T<sub>m</sub> (del inglés <i>melting temperature</i> o temperatura de fusión del DNA); (d), oligonucleótido degenerado; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; la modalidad de PCR se indica con los subíndices: E, específico; H, hemiespecífico; N, anidado; SEC, reacción de secuenciación nucleotídica. Y representa a los desoxinucleótidos C, T, e I a la base universal inosina. Los oligonucleótidos LP6, LP7 y CH1 fueron diseñados por la autora; el oligonucleótido TH10 (ENTA1) fue diseñado por Aymerich (1996); los oligonucleótidos LP5 (ENTP5), LA1 (ENTA2), ENTB3 y ENTB5 fueron diseñados por Casaus (1998); los oligonucleótidos SK2 y TH8 poseen secuencias específicas del vector comercial pBluescript II SK+.</p>			

### III.2.9.3. Visualización y análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) con 0,3 mg/ml de bromuro de etidio, de manera análoga a la descrita en la sección III.2.8.2.

### III.2.9.4. Secuenciación de los productos de PCR

En aquellos casos en los que fue necesario, los productos de PCR se extrajeron de los geles de agarosa empleando el *kit* comercial “QIAEX II Gel Extraction” (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania). En todos los casos, con el objeto de eliminar cebadores y otras impurezas que pudieran interferir en la reacción de secuenciación, los productos de PCR se purificaron empleando las minicolumnas con gel de sílica del *kit* comercial “QIAquick PCR purification” (Qiagen). En ambos casos se siguió el protocolo especificado en los manuales de los productos.

La secuenciación nucleotídica de ambas hebras de los productos de PCR purificados se realizó mediante el método enzimático de Sanger o método didesoxi de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977). La técnica se basa en la síntesis de DNA, a partir de un molde de cadena sencilla, por el enzima DNA polimerasa I en presencia de los cuatro 2'-desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y de los análogos 2'-3'-didesoxi marcados con distintos compuestos fluorescentes. La incorporación de un análogo 2'-3'-didesoxi impide el crecimiento posterior de la cadena, ya que carece del grupo 3'-hidroxilo necesario para formar el enlace fosfodiéster. Una vez finalizada la reacción, se obtienen fragmentos de DNA de diferente longitud que se separan por electroforesis en geles de acrilamida. La fluorescencia de los fragmentos es detectada y analizada por un *software* asociado al secuenciador y convertida en señales eléctricas que proporcionan una representación gráfica (electroforetograma) así como una secuencia de DNA en formato de texto.

Las reacciones de secuenciación (10 µl) se realizaron en un secuenciador automático ABIPrism™ 377 (Perkin Elmer), empleando 2 µl del *kit* de secuenciación de DNA “Ready Reaction”, con terminadores didesoxi marcados y DNA polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer), 5 pmoles del cebador específico y 180 ng del DNA problema resuspendido en una solución 5:1 de formamida al 95% y azul dextrano (50 mg/ml en EDTA 25mM, pH 8,0). El análisis de las secuencias resultantes se realizó en un ordenador “Power Macintosh” equipado con un *software* para la recolección y análisis de las secuencias y una impresora a color.

### **III.2.10. ANÁLISIS GENÉTICO PARCIAL DEL OPERÓN DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* AA13 Y *E. faecium* G16 Y DE LOS OPERONES DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE *E. faecium* P21. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES ESTRUCTURALES DE BACTERIOCINAS DEL TIPO PEDIOCINA DIFERENTES DE LAS ENTEROCINAS P, A Y B**

Una vez visualizados los genes estructurales de la enterocina P en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, y los de las enterocinas A y B en *E. faecium* P21, se procedió al análisis parcial de los operones de dichas enterocinas en las cepas objeto de estudio. Asimismo, se investigó la presencia en estas cepas de genes estructurales que codificaran bacteriocinas del tipo pediocina (clase IIa) distintas de la enterocina P en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, y de la enterocina A en *E. faecium* P21.

#### **II.2.10.1. Restricción del DNA total de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

Las endonucleasas de restricción son enzimas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster del DNA de cadena doble en sitios específicos denominados secuencias diana. La longitud y composición de bases de la secuencia diana son específicas para cada enzima de restricción, pero, generalmente, se trata de secuencias palindrómicas y cortas (entre 4 y 8 pb). Cuando el lugar de corte es el mismo en las dos cadenas del DNA, se generan fragmentos de extremos romos, mientras que, en el caso contrario, se obtienen fragmentos de extremos cohesivos. El número y tamaño de los fragmentos generados por un tratamiento de restricción depende de la frecuencia de aparición de la secuencia diana en el DNA a digerir.

El DNA total de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 se trató con los enzimas de restricción *DraI*, *EcoRV* y *RsaI* y el DNA total de *E. faecium* P21 con *EcoRV* y *HincII*. Los enzimas de restricción y sus correspondientes tampones fueron suministrados por Promega (Madison, EE.UU.), a excepción de *DraI*, suministrado por New England Biolabs. Los tratamientos de restricción se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989).

#### **III.2.10.2. Restricción del vector fagémido pBluescript II SK +**

El vector pBluescript II SK + es un fagémido de 2.961 pb derivado del plásmido pUC19. Este fagémido contiene el replicón del plásmido ColE1, el origen de replicación del bacteriófago filamentoso f1, el gen que codifica la resistencia al antibiótico ampicilina y un fragmento del gen



*lacZ* de *E. coli* que codifica el fragmento amino-terminal del enzima  $\beta$ -galactosidasa (inactivo enzimáticamente). Localizados en este gen se encuentran sitios de restricción únicos para 21 enzimas de restricción concentrados en un sitio de clonación múltiple (MCS, del inglés *Multiple Cloning Site*), flanqueados por los promotores transcripcionales T3 y T7.

El vector pBluescript II SK + (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) se trató con el enzima de restricción *HincII*, según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Una vez finalizado el tratamiento, el vector de clonación, linealizado y con extremos cohesivos, se trató con el enzima fosfatasa alcalina de cordero (CIP) (Promega) para evitar su circularización.

#### **III.2.10.3. Ligación de los fragmentos de restricción del DNA total de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 en el vector pBluescript II SK +**

Los fragmentos de restricción del DNA total de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se ligaron en el vector pBluescript II SK + linealizado, mediante una reacción catalizada por el enzima DNA-ligasa del bacteriófago T4 (Promega) según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

#### **III.2.10.4. Amplificación de regiones del genoma de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 mediante PCR hemiespecífico y PCR anidado**

Los cebadores empleados en las reacciones de amplificación mediante las técnicas de PCR hemiespecífico y PCR anidado se muestran en la Tabla III.2. El PCR hemiespecífico se realizó con los cebadores CH1, LP6 y TH10, diseñados a partir de la secuencia consenso de las bacteriocinas de la clase IIa, del gen estructural de la enterocina P y del gen estructural de la enterocina A, respectivamente; como cebadores con secuencia complementaria al vector pBluescript II SK + se emplearon SK2 y TH8.

En el PCR anidado se utilizó como DNA molde el producto de una reacción de PCR hemiespecífico con los cebadores LP6 y TH8, y como cebadores la pareja de oligonucleótidos LP5 y SK2.

Las reacciones de amplificación se realizaron de manera análoga a la descrita en la sección III.2.9.2, con la excepción de la temperatura de hibridación de los cebadores, que osciló entre 47 y 55°C, y de la duración de la polimerización, que varió entre 45 s y 2 min.

La visualización de los productos de PCR, así como su purificación, secuenciación y el análisis de sus secuencias nucleotídicas, se realizó de la manera descrita en las secciones III.2.9.3. y III.2.9.4.

### III.2.11. SERVIDORES Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS

A continuación se indican las direcciones electrónicas de los servidores de Internet y programas informáticos empleados en el presente trabajo:

1) Servidor “**ExPASy WWW**” del Swiss Institute of Bioinformatics (Appel *et al.*, 1994).

Dirección de Internet: <http://www.expasy.ch>

1.1. Programa *ProtParamTool*: proporciona información acerca de las características de una secuencia aminoacídica determinada, tales como su peso molecular, punto isoeléctrico teórico, composición aminoacídica, número de residuos con carga positiva y negativa, composición atómica, coeficiente de extinción molar, estabilidad, índice alifático e hidrofobicidad (índice GRAVY).

1.2. Programa *HMMTOP*: predice segmentos transmembrana de proteínas.

1.3. Programas para alineamientos múltiples de secuencias aminoacídicas:

- *Clustal W* version 1.8 (Thompson *et al.*, 1994)
- *Dialign2* (Morgenstern *et al.*, 1999)
- *MultAlin* version 5.4.1. (Corpet *et al.*, 1988)

2) Servidor del “**National Center for Biotechnology Information**” de la University of Illinois

Dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.1. Programa *BLAST 2.0* (Altschul *et al.*, 1997): realiza la búsqueda de homologías de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas.

3) Servidor “**Biology Workbench 3.2**” de la University of Illinois

Dirección de Internet: <http://www.sdsc.edu> o <http://biology.ncsa.uiuc.edu>

3.1. Programa *GREASE* (Kyte y Doolittle, 1982): realiza una predicción de la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de una proteína.

4) Servidor “**Bioinformatics Resources**”.

Dirección de Internet: <http://web.umassmed.edu>

Permite, entre otras aplicaciones, realizar alineamientos múltiples de secuencias, analizar marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*) y predecir la existencia de péptidos señal.

5) Servidor “**GCG**” del Wisconsin Genetics Computer Group (Devereux *et al.*, 1994).

Dirección de Internet: (telnet) 150.244.12.7

Permite, entre otras aplicaciones, el análisis de ORF, la búsqueda de homologías de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas, el alineamiento múltiple de secuencias y la búsqueda de secuencias repetidas directas e inversas de una secuencia nucleotídica.

### III.3. RESULTADOS

#### III.3.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS FRENTE A DIVERSOS MICROORGANISMOS INDICADORES

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21, determinada mediante el método de difusión en agar (sección III.2.2.2), se muestra en la Tabla III.3.

Los sobrenadantes de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 mostraron un espectro de actividad antimicrobiana similar entre sí y diferente al del sobrenadante de *E. faecium* P21 frente a las cepas de bacterias lácticas empleadas como indicadores; así, por ejemplo, *P. pentosaceus* FBB63 y *P. pentosaceus* PC1 fueron inhibidos únicamente por los sobrenadantes de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, mientras que *Lb. fermentum* CECT285, *Lb. plantarum* NCDO1193, *Lb. sakei* 148, *P. pentosaceus* FBB61 y *E. faecium* L50 tan solo fueron sensibles al sobrenadante de *E. faecium* P21. Los microorganismos indicadores *Lb. casei* 334, *L. lactis* BB24 y *P. acidilactici* 347 no resultaron inhibidos en ningún caso.

Por otra parte, los sobrenadantes de las tres cepas ejercieron una fuerte inhibición del desarrollo de *E. faecalis* EF y *Prop. acidipropionici* P4. Asimismo, es interesante destacar la potente actividad ejercida por los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 frente a las cinco cepas de *Ls. monocytogenes* evaluadas. Además, las tres cepas analizadas inhibieron el desarrollo de otros patógenos de las especies *Cl. botulinum*, *Cl. perfringes* y *St. aureus*.

#### III.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EXOCELULAR CRUZADA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS SELECCIONADAS E INMUNIDAD A SUS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS

En la Tabla III.4 se muestra la actividad antimicrobiana cruzada de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21, así como su actividad inhibidora frente a *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136, cepas productoras de la enterocina P y de las enterocinas A y B, respectivamente.

**Tabla III.3. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

Microorganismo indicador	Cepa	Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes <sup>a</sup> :		
		AA13	G16	P21
<i>Lb. casei</i>	334	ZIND	ZIND	ZIND
<i>Lb. fermentum</i>	285	ZIND	ZIND	13,9
<i>Lb. plantarum</i>	1193	ZIND	ZIND	16,5
<i>Lb. sakei</i>	2714	13,1	11,2	ZIND
<i>Lb. sakei</i>	148	ZIND	ZIND	11,1
<i>L. lactis</i>	BB24	ZIND	ZIND	ZIND
<i>L. lactis</i>	CNRZ117	13,6	13,5	14,1
<i>P. acidilactici</i>	347	ZIND	ZIND	ZIND
<i>P. pentosaceus</i>	FBB61	ZIND	ZIND	10,2
<i>P. pentosaceus</i>	FBB63	9,3	10,2	ZIND
<i>P. pentosaceus</i>	PC1	18,9	18,3	ZIND
<i>E. faecium</i>	L50	ZIND	ZIND	15,5
<i>E. faecalis</i>	EF	17,2	16,7	16,3
<i>Prop. acidipropionici</i>	P4	12,6	12,1	12,1
<i>Ls. monocytogenes</i>	7973	16,7	14,7	16,4
<i>Ls. monocytogenes</i>	LI5sv1/2	18,5	15,2	17,2
<i>Ls. monocytogenes</i>	5105	16,2	17,1	17,7
<i>Ls. monocytogenes</i>	LI1sv4	16,1	15,7	17,5
<i>Ls. monocytogenes</i>	Scott A	19,3	16,2	18,4
<i>St. aureus</i>	137	16,4	14,5	17,7
<i>St. aureus</i>	196E	18,7	16,2	17,2
<i>St. aureus</i>	349	19,3	16,1	17,6
<i>St. aureus</i>	361	15,3	16,6	17,8
<i>Cl. perfringens</i>	376	14,1	13,1	15,2
<i>Cl. botulinum</i>	551	16,7	12,5	15,5

<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana evaluada mediante el método de difusión en agar y expresada como el diámetro del halo de inhibición en mm. ZIND: zona de inhibición no detectada empleando 100 µl de sobrenadante. Las abreviaturas de los géneros bacterianos aparecen en el Apéndice 1.

**Tabla III.4. Actividad antimicrobiana cruzada de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16, *E. faecium* P21, *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 e inmunidad a sus sustancias antimicrobianas exocelulares**

Microorganismo indicador	Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes <sup>a</sup> :				
	AA13	G16	P21	P13	T136
<i>E. faecium</i> AA13	ZIND	ZIND	11,3	ZIND	15,4
<i>E. faecium</i> G16	ZIND	ZIND	11,3	ZIND	15,1
<i>E. faecium</i> P21	12,8	12,1	ZIND	13,1	ZIND
<i>E. faecium</i> P13	ZIND	ZIND	12,0	ZIND	14,4
<i>E. faecium</i> T136	12,2	13,5	ZIND	13,7	ZIND

<sup>a</sup>Actividad antimicrobiana evaluada mediante el método de difusión en agar y expresada como el diámetro del halo de inhibición en mm. ZIND, zona de inhibición no detectada empleando 100 µl de sobrenadante

De los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- (1) *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 poseen espectros de acción similares entre sí y al de *E. faecium* P13, no se inhiben mutuamente y no inhiben a *E. faecium* P13.
- (2) *E. faecium* P21 muestra un espectro de acción similar al de *E. faecium* T136 y distinto al de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P13, y no inhibe a *E. faecium* T136.
- (3) Las cepas productoras son inmunes a la acción de las sustancias antimicrobianas presentes en sus sobrenadantes.

### III.3.3 ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES PRODUCIDAS POR *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21

El efecto del tratamiento con enzimas proteolíticos, amilolíticos y lipolíticos, del pH y de la temperatura en la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se muestra en la Tabla III.5.

Los enzimas proteolíticos tripsina, papaína, pepsina y proteasa II abolieron totalmente la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las tres cepas analizadas, mientras que los enzimas amilolíticos y lipolíticos no ejercieron ningún efecto en su actividad antimicrobiana. Dichos

**Tabla III.5. Actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 tras diversos tratamientos físico-químicos**

Actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes (%) <sup>a</sup>				
		<i>E. faecium</i> AA13	<i>E. faecium</i> G16	<i>E. faecium</i> P21
<u>Tratamientos enzimáticos</u>				
Tripsina		0	0	0
Papaína		0	0	0
Pepsina		0	0	0
Proteasa II		0	0	0
$\alpha$ -amilasa		100	100	100
Lipasa I		100	100	100
<u>Estabilidad frente al pH</u>				
2,0-11,0 <sup>b</sup>		100	100	100
<u>Tratamientos térmicos</u>				
80°C	10 min	100	100	100
	20 min	90	100	100
100°C	10 min	100	100	100
	20 min	90	89	100
<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana residual evaluada mediante el ensayo en placas microtituladoras (sección II.2.4.4) y expresada como el porcentaje de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes con respecto a la actividad original de los mismos. <sup>b</sup> La estabilidad de los sobrenadantes se ensayó a pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 tras su incubación a 4 y 32°C durante 24 h.				

resultados sugieren que la actividad antimicrobiana de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se debe a un compuesto de naturaleza proteica (bacteriocina) cuya actividad biológica no depende de componentes de naturaleza lipídica ni glucídica. Los controles positivos de actividad antimicrobiana (sobrenadantes sin enzimas) mostraron actividad en todos los casos.

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes con el pH ajustado a valores entre 2 y 11 e incubados a 4 y 32°C durante 24 h no difirió significativamente y fue muy similar a la de los sobrenadantes conservados a -20°C empleados como control. De los resultados obtenidos se deduce que las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 conservan su actividad antimicrobiana en un amplio intervalo de pH. Tras el tratamiento térmico de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 a 80°C durante 20 min se observó una pérdida de actividad antimicrobiana únicamente en el sobrenadante de *E. faecium* AA13 (aproximadamente del 10%), conservando los sobrenadantes de las otras dos cepas el 100% de su actividad antimicrobiana. El tratamiento térmico de los sobrenadantes a 100°C durante 20 min originó una pérdida del 10% de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, mientras que el sobrenadante de *E. faecium* P21 mantuvo íntegramente su actividad antimicrobiana tras dicho tratamiento. Dichos resultados indican que la actividad antimicrobiana de las tres cepas está mediada por moléculas termorresistentes.

#### **III.3.4. EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MRS, BHI Y APT PARA LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

*E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se inocularon en los medios de cultivo complejos APT, MRS y BHI. Tras 16 h de incubación a 32°C, se obtuvieron sus sobrenadantes y se determinó su actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar. La actividad antimicrobiana de las tres cepas se muestra en la Tabla III.6.

Bajo las condiciones de incubación descritas, el medio óptimo para la producción/detección de las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 fue el caldo MRS. No obstante, las diferencias de actividad antimicrobiana observadas empleando MRS y APT fueron menores que las existentes entre cada uno de ellos y el caldo BHI, medio en el que, a pesar de obtenerse un crecimiento microbiano comparable al obtenido en los medios MRS y APT, se detectó menor actividad antimicrobiana en el sobrenadante de las tres cepas.



**Tabla III.6. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las cepas *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 cultivadas en los caldos APT, MRS y BHI**

Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes <sup>a</sup>			
Caldo de cultivo	<i>E. faecium</i> AA13	<i>E. faecium</i> G16	<i>E. faecium</i> P21
APT	13,2	13,1	13,7
MRS	14,1	15,7	14,7
BHI	10,1	10,7	11,2
<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes evaluada mediante el método de difusión en agar y expresada como el diámetro de la zona de inhibición en mm.			

### III.3.5. CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 EN CALDO MRS

Una vez seleccionado el caldo MRS para la producción de las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21, se realizaron curvas de crecimiento y de producción/detección de la actividad antimicrobiana para cada una de las cepas desarrolladas en caldo MRS a 32°C. En la Fig. 3.1 se muestra la relación entre el crecimiento (log ufc/ml), el pH del cultivo y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las tres cepas. Los resultados obtenidos se resumen a continuación:

- 1) El crecimiento máximo de *E. faecium* AA13 ( $9,6 \times 10^9$  ufc/ml), *E. faecium* G16 ( $9,8 \times 10^9$  ufc/ml) y *E. faecium* P21 ( $9,2 \times 10^9$  ufc/ml) se obtuvo tras 12 h de incubación a 32°C.
- 2) La actividad antimicrobiana máxima de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* P21 se detectó a las 12 h de incubación (final de la fase exponencial de crecimiento), mientras que en el caso de *E. faecium* G16 se detectó a las 18 h (fase estacionaria de crecimiento). A las 24 h, la actividad antimicrobiana residual de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 representó el 79, 92 y 83% de su actividad antimicrobiana máxima, respectivamente. Tras 48 h de incubación no se detectó actividad antimicrobiana en el sobrenadante de *E. faecium* AA13 ni en el de *E.*

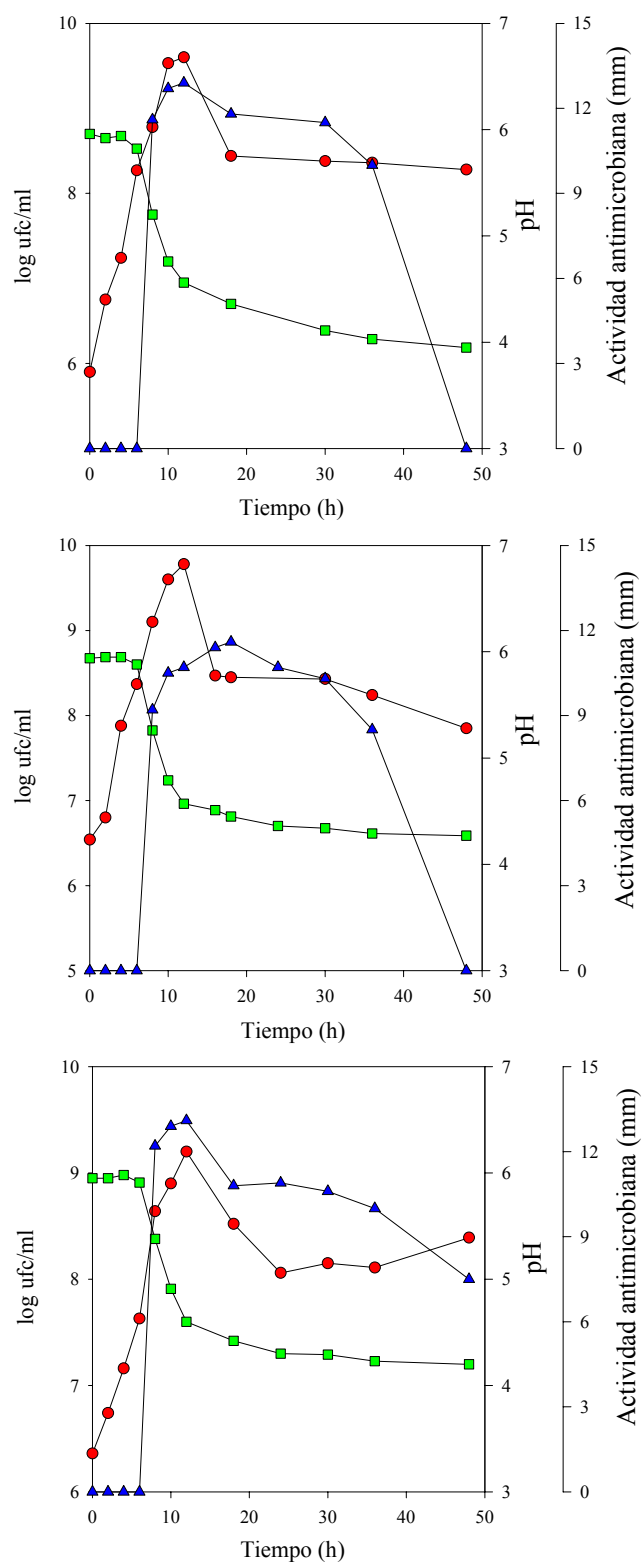
*faecium* G16, mientras que el sobrenadante de *E. faecium* P21 mantuvo un 57% de su actividad antimicrobiana máxima.

- 3) La evolución del pH en los tres cultivos fue paralela, con una fase de descenso rápido correspondiente a la fase exponencial del crecimiento del cultivo, seguida de una fase de descenso más lento y de estabilización a pH 4,2.

### **III.3.6. PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD DE LAS BACTERIOCINAS DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21. DETERMINACIÓN DE SU SECUENCIA AMINOACÍDICA**

La purificación de las bacteriocinas se llevó a cabo a partir de los sobrenadantes libres de células obtenidos de 1 l de cultivo en MRS de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 según el protocolo descrito en la sección III.2.7.1. La actividad antimicrobiana se detectó y cuantificó mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.4.4.), empleando como microorganismos indicadores *E. faecium* T136, para la purificación de las bacteriocinas de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, y *E. faecium* P13, para la purificación de las bacteriocinas de *E. faecium* P21. El protocolo de purificación de las bacteriocinas de las tres cepas se muestra en las Tablas III.7, III.8 y III.9, en las que se aprecia, entre otros resultados, el incremento de la actividad antimicrobiana específica y el porcentaje de recuperación de la actividad antimicrobiana en cada una de las etapas del proceso de purificación.

La actividad antimicrobiana inicial de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 fue similar (135.300 y 192.600 UB, respectivamente); en cambio, el sobrenadante de *E. faecium* P21 mostró una actividad antimicrobiana inicial considerablemente superior (521.000 UB). La recuperación de la actividad antimicrobiana tras la precipitación de los sobrenadantes con sulfato amónico fue del 86, 55 y 44% para *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21, respectivamente. La cromatografía de filtración en gel mostró un rendimiento variable según las cepas, siendo óptimo para *E. faecium* P21 (72%). La cromatografía de intercambio catiónico resultó el paso cromatográfico más ineficaz. Por otra parte, la recuperación de la actividad antimicrobiana tras la cromatografía de interacción hidrofóbica fue similar en las tres cepas, alcanzándose valores del 3,8%, 5,9% y 5% para *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21, respectivamente.



**Fig. 3.1.** Crecimiento (—●—), actividad antimicrobiana (—▲—) y pH (—■—) de *E. faecium* AA13 (A), *E. faecium* G16 (B) y *E. faecium* P21 (C) desarrollados en caldo MRS a 32°C.

Tabla III.7. Purificación de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* AA13

	Volumen (ml)	A <sub>254</sub> total <sup>a</sup>	Actividad total (UB) <sup>b</sup>	Actividad específica	Incremento en la actividad específica	Recuperación (%)
Sobrenadante (Fracción I)	1.000	39.900	135.300	3,4	1	100
Precipitación con sulfato amónico (Fracción II)	100	640	115.900	181	53	86
Cromatografía de filtración en geles (Fracción III)	200	1.640	23.600	14	4	17
Cromatografía de intercambio catiónico (Fracción IV)	50	7,5	2.100	292	86	1,6
Cromatografía de interacción hidrofóbica (Fracción V)	10	2,6	5.200	2.000	589	3,8
Cromatografía en fase inversa (FPLC)						
Fracción A	1	0,040	140.000	350.400	103.603	10,3
Fracción B	0,5	0,015	1.100	76.452	22.252	0,87

<sup>a</sup>A<sub>254</sub> total, absorbancia a 254 nm multiplicada por el volumen en mililitros. <sup>b</sup>Actividad antimicrobiana total (UB), determinada por el ensayo en placas microtituladoras. <sup>c</sup>Actividad antimicrobiana específica, actividad antimicrobiana total (UB) dividida por la A total<sub>254</sub>. <sup>d</sup>Actividad antimicrobiana de la fracción correspondiente dividida por la del sobrenadante.

Tabla III.8. Purificación de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* G16

	Volumen (ml)	A <sub>254</sub> total <sup>a</sup>	Actividad total (UB) <sup>b</sup>	Actividad específica	Incremento en la actividad específica	Recuperación (%)
Sobrenadante (Fracción I)	1.000	51.600	192.600	3,7	1	100
Precipitación con sulfato amónico (Fracción II)	100	700	105.600	151	40	55
Cromatografía de filtración en geles (Fracción III)	200	840	107.700	128	34	56
Cromatografía de intercambio catiónico (Fracción IV)	50	10,3	7.400	723	194	3,8
Cromatografía de interacción hidrofóbica (Fracción V)	10	3,4	11.400	3.354	899	5,9
Cromatografía en fase inversa (FPLC)						
Fracción C	1,2	0,044	10.300	2.352.250	63.070	5,37
Fracción D	1	0,033	56.700	1.720.757	461.329	29,5

<sup>a</sup>A<sub>254</sub> total, absorbancia a 254 nm multiplicada por el volumen en mililitros. <sup>b</sup>Actividad antimicrobiana total (UB), determinada por el ensayo en placas microtituladoras. <sup>c</sup>Actividad antimicrobiana específica, actividad antimicrobiana total (UB) dividida por la A total<sub>254</sub>. <sup>d</sup>Actividad antimicrobiana de la fracción correspondiente dividida por la del sobrenadante.

Tabla III.9. Purificación de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* P21

	Volumen (ml)	A <sub>254</sub> total <sup>a</sup>	Actividad total (UB) <sup>b</sup>	Actividad específica	Incremento en la actividad específica	Recuperación (%)
Sobrenadante (Fracción I)	1.000	13.300	521.000	39,17	1	100
Precipitación con sulfato amónico (Fracción II)	100	860	227.600	265	7	44
Cromatografía de filtración en geles (Fracción III)	200	1340	377.379	282	7	72
Cromatografía de intercambio catiónico (Fracción IV)	50	6,75	29.132	4.316	110	6
Cromatografía de interacción hidrofóbica (Fracción V)	10	9,7	24.250	2.492	64	5
Cromatografía en fase inversa (FPLC)						
Fracción E	1,2	0,024	6.534	272.250	6.950	1,25
Fracción F	2,8	0,034	19.067	560.794	14.317	3,65
Fracción G	2,0	0,030	9.440	314.667	8.033	1,81

<sup>a</sup>A<sub>254</sub> total, absorbancia a 254 nm multiplicada por el volumen en mililitros. <sup>b</sup>Actividad antimicrobiana total (UB), determinada por el ensayo en placas microtituladoras. <sup>c</sup>Actividad antimicrobiana específica, actividad antimicrobiana total (UB) dividida por la A total<sub>254</sub>. <sup>d</sup>Actividad antimicrobiana de la fracción correspondiente dividida por la del sobrenadante.

Las muestras eluidas de la columna de interacción hidrofóbica y aplicadas a la columna de fase inversa PepRPC HR5/5 integrada en el sistema de FPLC dieron lugar a diversas fracciones cromatográficas con actividad antimicrobiana que se recromatografiaron en la misma columna, obteniéndose los cromatogramas que se muestran en las Figs. 3.2, 3.3 y 3.4. Finalmente, se obtuvieron dos fracciones en *E. faecium* AA13, que se denominaron A y B, con una actividad antimicrobiana total de 14.016 y 1.185 UB, respectivamente; asimismo, en *E. faecium* G16 se obtuvieron dos fracciones, denominadas C y D, cuya actividad antimicrobiana total fue de 10.300 y 56.700 UB, respectivamente; a partir de *E. faecium* P21 se obtuvieron tres fracciones, denominadas E, F y G con una actividad antimicrobiana total de 6.534, 19.067 y 9.440 UB, respectivamente.

Las fracciones purificadas por cromatografía en fase inversa se sometieron a secuenciación aminoacídica mediante degradación de Edman. Las secuencias aminoacídicas obtenidas se muestran con los respectivos cromatogramas en las Figs. 3.2, 3.3 y 3.4. A partir de las fracciones A, C y D se obtuvieron secuencias aminoacídicas de 20, 13 y 30 residuos, respectivamente; en la región N-terminal de estos péptidos se identificó parte de la secuencia aminoacídica consenso de las bacteriocinas de la clase IIa (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Aymerich *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000) y en el extremo N-terminal de las fracciones A y D y de la fracción C se identificaron las secuencias de aminoácidos ATRS y TR, respectivamente, descritas únicamente en la enterocina P. La secuenciación de la fracción B mediante degradación de Edman no fue posible debido a que su extremo N-terminal estaba bloqueado. Por otra parte, a partir de las fracciones E y F se obtuvieron secuencias de 31 y 20 aminoácidos, respectivamente, en las que, al igual que en las fracciones A, C y D, se detectó la secuencia aminoacídica YGNGVY en la región N-terminal. Además, la fracción E presentó la pareja de aminoácidos HG, y la fracción F la secuencia SG, ambas localizadas en el extremo N-terminal. La fracción G proporcionó una secuencia aminoacídica de 50 residuos con escasas incertidumbres y carente de la secuencia aminoacídica YGNGVY.

Las secuencias aminoacídicas obtenidas de los péptidos A, C, D, E y F se compararon con las de otras bacteriocinas de la clase IIa. Los péptidos A, C y D mostraron una elevada homología con la enterocina P (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998), y ligeramente inferior con la carnobacteriocina BM1 (Quadri *et al.*, 1994) y la sakacina A (Holck *et al.*, 1992); por otra parte, los péptidos E y F mostraron la homología más significativa con la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996; Casaus, 1998). El péptido G resultó prácticamente idéntico a la enterocina B (Casaus *et al.*, 1997; Casaus 1998) y únicamente presentó una homología significativa con la carnobacteriocina A/piscicolina 61

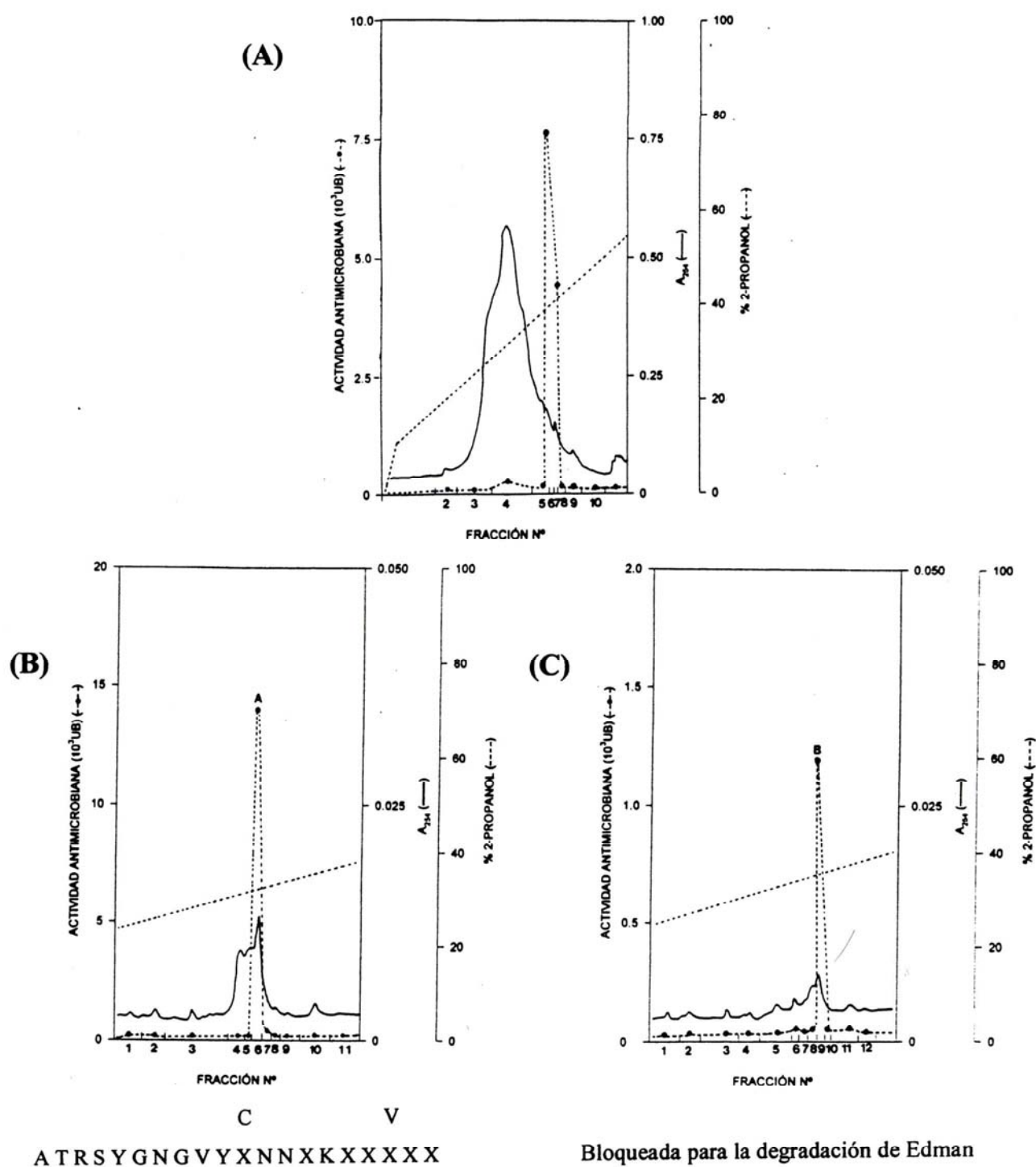


Fig. 3.2. Purificación de las bacteriocinas de *E. faecium* AA13 por cromatografía en fase inversa (FPLC) de la fracción procedente de la columna de interacción hidrofóbica (A); las fracciones con actividad antimicrobiana se recromatografiaron bajo condiciones similares, obteniéndose los cromatogramas B y C. La secuencia aminoacídica de la fracción A se muestra bajo el cromatograma correspondiente (B). El código de una letra de los aminoácidos se muestra en el Apéndice 2.



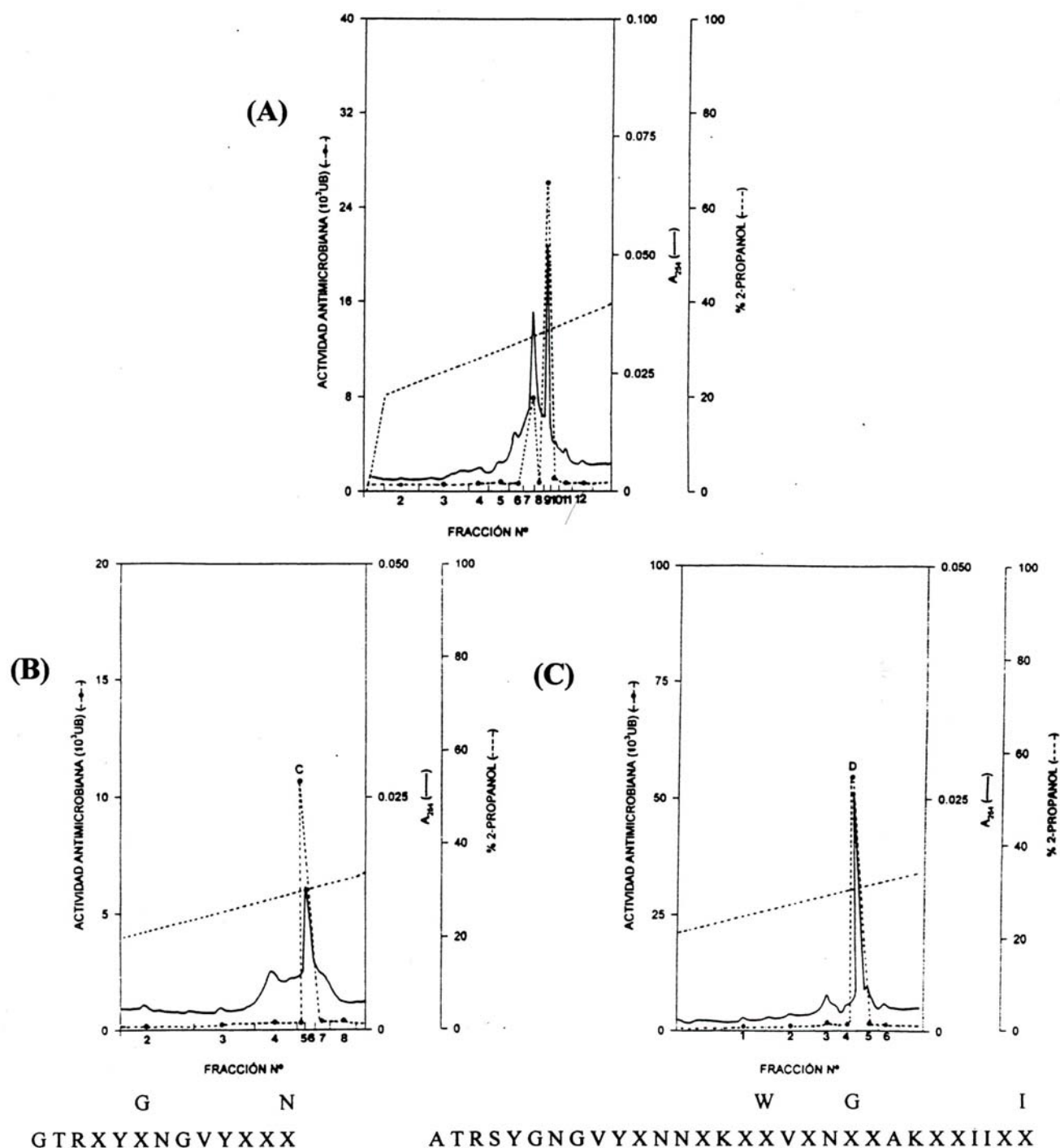


Fig. 3.3. Purificación de las bacteriocinas de *E. faecium* G16 por cromatografía en fase inversa (FPLC) de la fracción procedente de la columna de interacción hidrofóbica (A); las fracciones con actividad antimicrobiana se recromatografiaron bajo condiciones similares, obteniéndose los cromatogramas B y C. Las secuencias aminoacídicas de la fracciones C y D se muestran bajo los cromatogramas correspondientes (B y C, respectivamente). El código de una letra de los aminoácidos se muestra en el Apéndice 2.

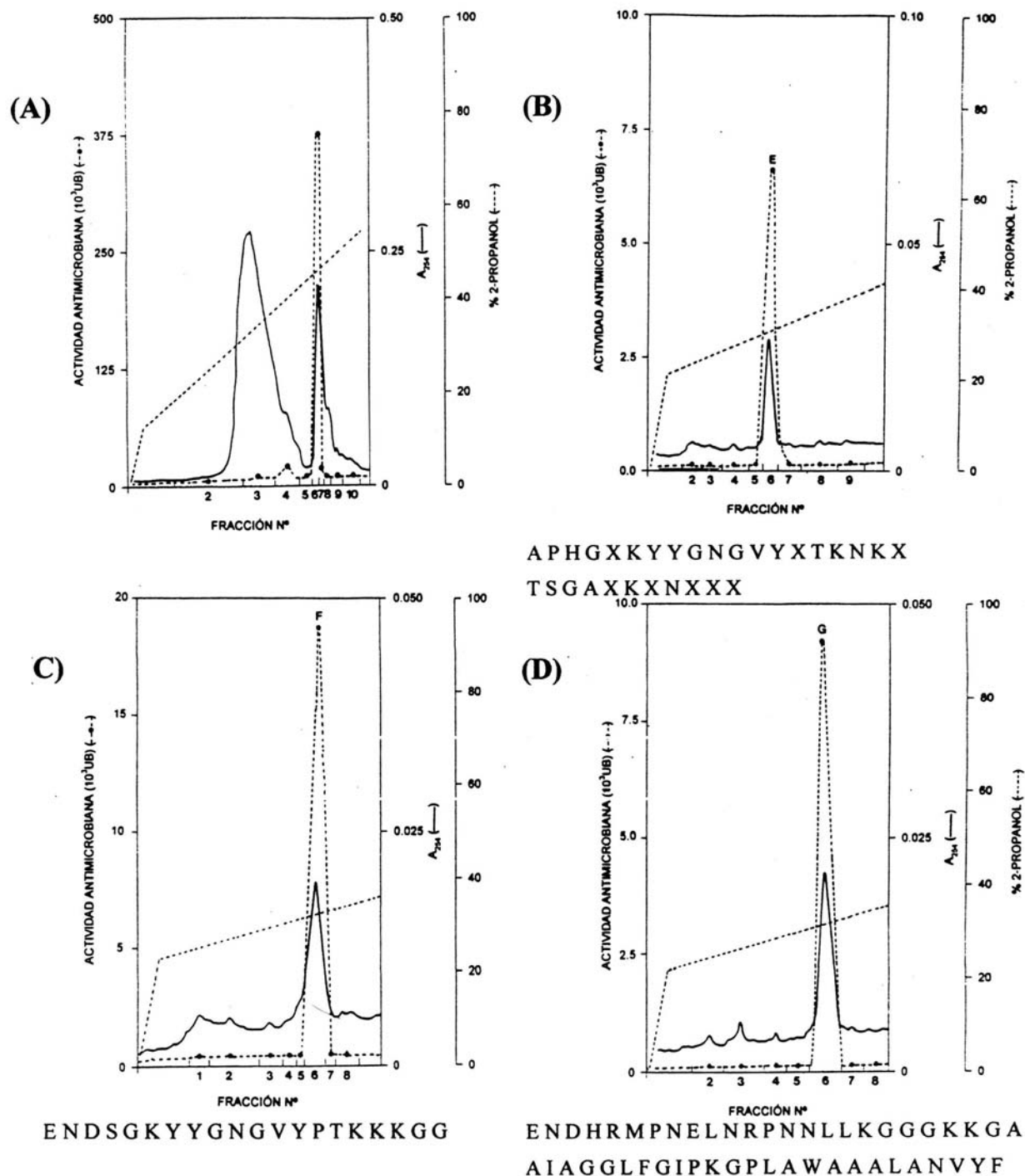


Fig. 3.4. Purificación de las bacteriocinas de *E. faecium* P21 por cromatografía en fase inversa (FPLC) de la fracción procedente de la columna de interacción hidrofóbica (A); las fracciones con actividad antimicrobiana se recromatografiaron bajo condiciones similares, obteniéndose los cromatogramas B, C y D. Las secuencias aminoacídicas de la fracciones E, F y G se muestran bajo los cromatogramas correspondientes (B, C y D, respectivamente). El código de una letra de los aminoácidos se muestra en el Apéndice 2.

(Worobo *et al.*, 1994; Holck *et al.*, 1994).

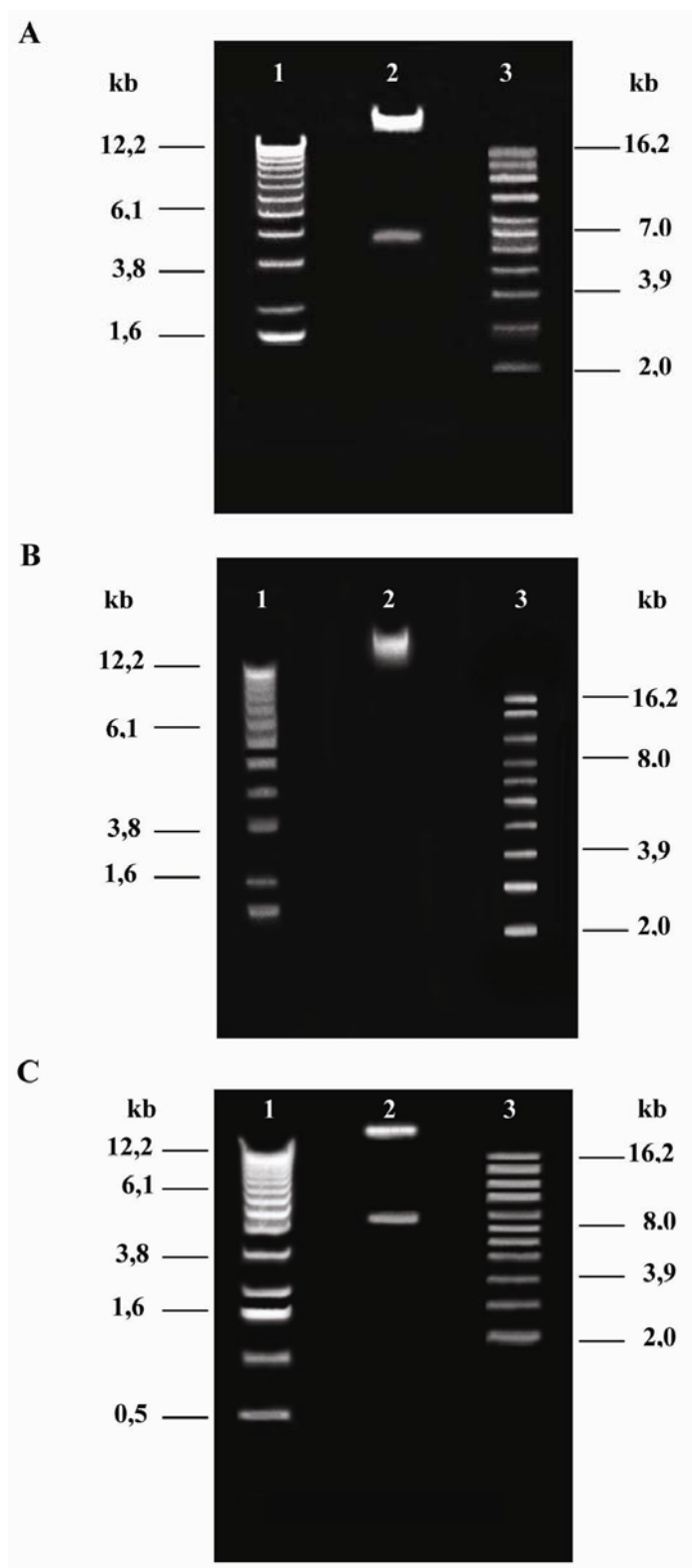
### III.3.7. AISLAMIENTO Y VISUALIZACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO Y CROMOSÓMICO DE *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21

El DNA cromosómico y plasmídico de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se aisló mediante una modificación del método de lisis alcalina descrito por Anderson y McKay (1983). Los resultados del análisis del DNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% se muestran en la Fig. 3.5. En lo que respecta al DNA plasmídico, *E. faecium* AA13 presentó un plásmido de 6,9 kb y *E. faecium* P21 uno de 7,9 kb. Sin embargo, el método de aislamiento de DNA empleado no permitió detectar la presencia de ningún plásmido en *E. faecium* G16.

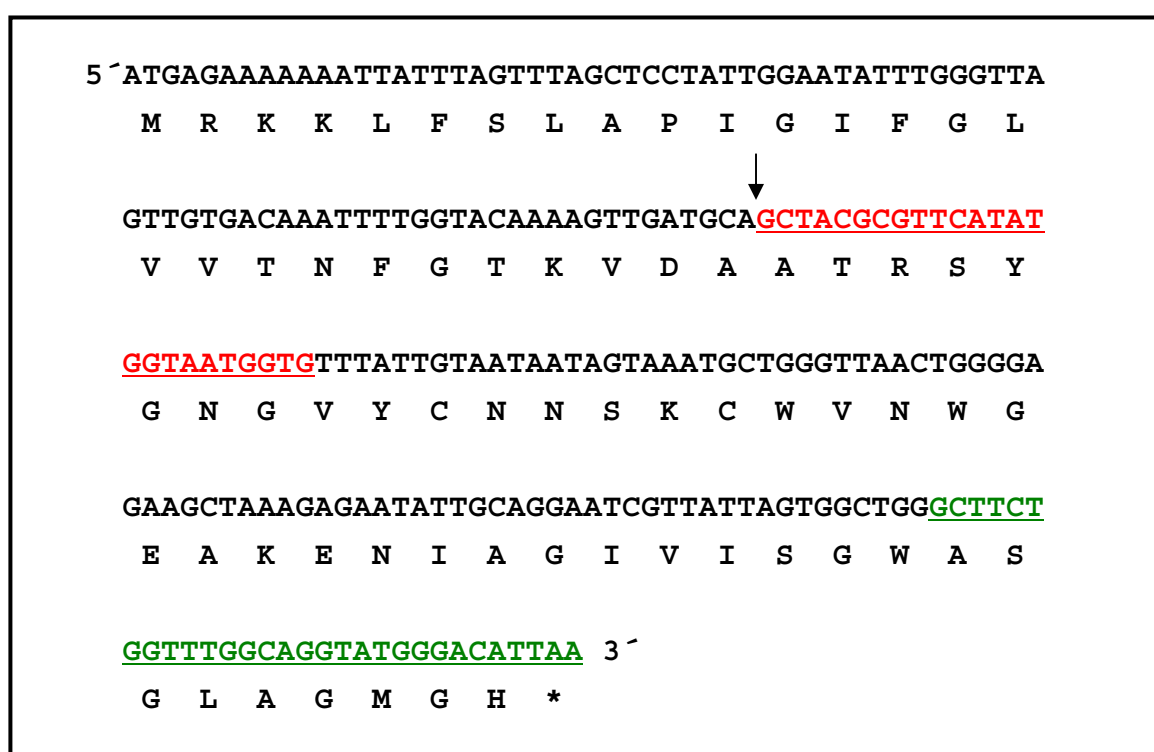
### III.3.8. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENTEROCINA P EN *E. faecium* AA13 Y *E. faecium* G16 Y DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LAS ENTEROCINAS A Y B EN *E. faecium* P21. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Dado que las secuencias aminoacídicas de las fracciones A, C y D presentaban una alta homología con la de la enterocina P de *E. faecium* P13 (sección III.3.6), se procedió a la detección del gen estructural de dicha enterocina en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 mediante su amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos LP6 y LP7 (Fig.3.6). En la Fig.3.7A se muestran los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores LP6 y LP7 a partir del DNA total de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16. *E. faecium* P13, productor de enterocina P, se utilizó como control positivo en la amplificación del gen estructural de la enterocina P (*entP*). En las tres cepas se obtuvo una banda del tamaño esperado (134-154 pb). Los productos de PCR de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 se purificaron y, posteriormente, se secuenciaron ambas hebras mediante el método didesoxi empleando los cebadores LP6 y LP7. En ambos casos se obtuvo una secuencia de 132 pb idéntica a la del gen estructural de la enterocina P de *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998).

Con respecto a las fracciones obtenidas a partir de *E. faecium* P21, los péptidos E y F presentaron una alta homología con la enterocina A (Aymerich, 1996; Casaus, 1998), mientras que la fracción G resultó prácticamente idéntica a la enterocina B (Casaus *et al.*, 1997; Casaus, 1998) (sección III.3.6). Así pues, en *E. faecium* P21 se procedió a la amplificación mediante PCR específico del gen estructural de la enterocina A (*entA*) con los cebadores TH10 y LA1 y del gen estructural de la enterocina B (*entB*) con los cebadores ENTB3 y ENTB5. Como se observa en la



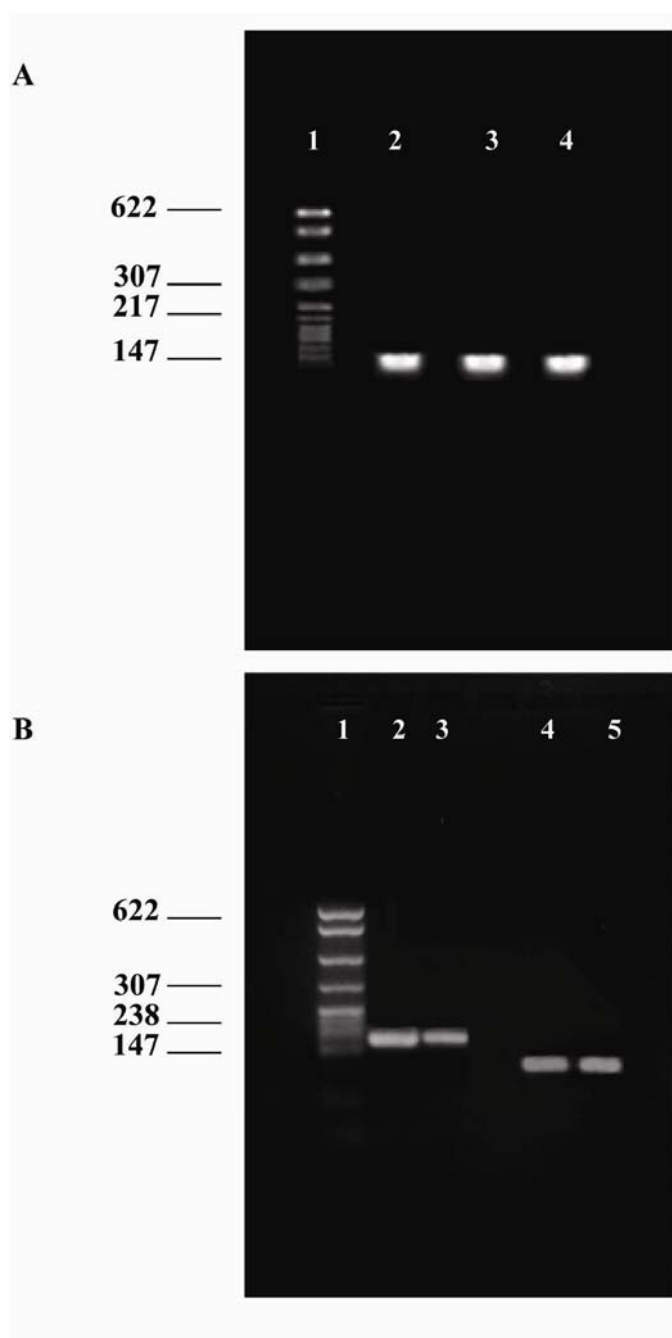
**Fig. 3.5.** Electroforesis en geles de agarosa del DNA cromosómico y plasmídico de *E. faecium* AA13 (A), *E. faecium* G16 (B) y *E. faecium* P21 (C). En las columnas 1 y 3 se muestran los marcadores de tamaño molecular del DNA lineal (“1-kb DNA ladder”) y plasmídico, respectivamente.



**Fig. 3.6. Diseño de los cebadores LP6 y LP7 a partir de la secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina P (*entP*).** La secuencia nucleotídica de *entP* se obtuvo de los trabajos de Cintas *et al.* (1997) y Casaus (1998). El punto de procesamiento de la preproenterocina P está señalado con una flecha vertical. En rojo, se indica la secuencia del cebador LP6 y, en verde, la complementaria a la del cebador LP7. El código genético y las abreviaturas de los aminoácidos se muestran en el Apéndice 2.

Fig.3.7B, tras la reacción de amplificación se obtuvo una banda del tamaño esperado (160-180 pb) en *E. faecium* P21 y en *E. faecium* T136 (control positivo) a partir del DNA total de cada una de las cepas con los cebadores TH10 y LA1; por otra parte, la amplificación a partir del DNA total de ambas cepas con los cebadores ENTB3 y ENTB5 proporcionó también una banda del tamaño esperado (ligeramente inferior a 147 pb) (Fig. 3.7B). Una vez purificados los productos de PCR obtenidos con el DNA de *E. faecium* P21 y los cebadores descritos, se procedió a su secuenciación nucleotídica mediante el método didesoxi, empleando los mismos cebadores que los utilizados en la reacción de amplificación.

El producto obtenido con los cebadores TH10 y LA1 proporcionó una secuencia de 172 pb que resultó idéntica a la de parte de *entA* de *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996) y *E. faecium* T136 (Casaus, 1998); asimismo, a partir del producto de PCR obtenido con los cebadores ENTB3 y ENTB5, se obtuvo una secuencia de 126 pb que fue idéntica a la de parte de *entB* de *E. faecium* T136 (Casaus *et al.*, 1997; Casaus, 1998)



**Fig. 3.7.** Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a: (A) *entP* en *E. faecium* AA13 (2), *E. faecium* G16 (3) y *E. faecium* P13 (4); (B) *entA* en *E. faecium* P21 (2) y *E. faecium* T136 (3) y *entB* en *E. faecium* P21 (4) y *E. faecium* T136 (5). En las columnas 1 se muestran los marcadores de tamaño molecular del DNA lineal (“pBR322 DNA-*MspI* Digest”).

### III.3.9. ANÁLISIS GENÉTICO PARCIAL DEL OPERÓN DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* AA13 Y *E. faecium* G16 Y DE LOS OPERONES DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE *E. faecium* P21. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES ESTRUCTURALES DE BACTERIOCINAS DE LA FAMILIA DE LA PEDIOCINA DISTINTAS A LAS ENTEROCINAS P Y A.

#### III.3.9.1. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3' del DNA de *E. faecium* G16

La pareja de cebadores LP6 y SK2 se utilizó junto con el DNA de *E. faecium* AA13, digerido con *EcoRV* o *RsaI* y ligado en el vector pBluescript II SK+, en la técnica de PCR hemiespecífico. En ambos casos se obtuvieron múltiples productos de PCR, cuyo tamaño máximo fue de aproximadamente 1.600 y 500 pb en las mezclas de ligación de *EcoRV* y *RsaI*, respectivamente. Mediante el empleo de la misma técnica y la misma pareja de cebadores, se obtuvieron productos únicos, ligeramente mayores de 500 pb, a partir del DNA de *E. faecium* G16 digerido con *DraI* o *RsaI*; sin embargo, a partir del digerido con *EcoRV* se obtuvo un producto mayoritario de aproximadamente 1.600 pb.

Los productos de PCR únicos obtenidos con las mezclas de ligación *DraI* y *RsaI* de *E. faecium* G16 se purificaron y se secuenciaron con los cebadores LP5, LP6 y SK2. El ensamblaje de las secuencias obtenidas con los distintos cebadores proporcionó una secuencia final de 707 pb contiguos (Fig. 3.8), de los que 205 no habían sido secuenciados con anterioridad. La comparación de esta secuencia con la del operón de la enterocina P de *E. faecium* P13 (Casaus, 1998) mostró la identidad en ambas cepas de 502 pb distribuidos entre una parte de *entP* (135 pb), el gen que codifica para la proteína de inmunidad (*entiP*, 267 pb), la región adyacente a *entiP* (96 pb) y el espacio intergénico entre *entP* y *entiP* (4 pb).

El análisis del resto de la secuencia (205 pb), localizada detrás de la región adyacente a *entiP*, reveló la existencia de un ORF, designado *orf4*, con la misma polaridad que *entP* y *entiP*. Dicho *orf4* está precedido por dos secuencias hexaméricas separadas por 15 pb, correspondientes a las regiones -35 (TTGTAA) y -10 (TTTTAA) del hipotético promotor de la transcripción, y por la región de unión al ribosoma (región Shine-Dalgarno, S.D.) (AGAAAT) situada a una distancia de 4 pb por delante del codón de iniciación de la traducción (ATG). El péptido hipotéticamente codificado por *orf4* (designado ORF4) consta de 26 aminoácidos y no presenta ninguna homología significativa con las proteínas de las bases de datos consultadas.



1	CTCAGTATTTGTACACAAAAATTCGAAAAATATTCTATAGCTTTATAGAAGGGCCAACAACTTTAAAGG
71	TTTTGATCCTGTTTAAATTTCTCATTTCAGCGTTCTTTCAATAGTTCACTTAATTAAGTTCAGATAGATA
	-10 S.D. -35
141	TAAAATTAGATCTCAATAGGGTATACTCCAGAAATGGAAGAATATGAAAATCAAGTAGCAAAATATTTGA
	<i>orfx</i> M E E Y E N Q V A K Y L
211	GAAAAGTAGGAAATTATGCGCGTTATTGTGTGACACACGATTTTCTAGGGAATGAATTAATCCCCGAAG
	R K V G N Y A R Y C V T H D F L G N E L I P R R
	SRIi SRDi1 SRDd1
281	AATACAAATGAGATTAGTTTTTAACAATGATTTTTTATTGCCATTATGCTTTCAAACAACCTGTTTATGAT
	I Q M R L V L T M I F Y C H Y A F K T T V Y D
	-35 SRId -10 S.D.
351	ATAATTATCAAATTTTCTAAAAATCATTTATAATTATTTAGAAAAAGGAGGTATTGATTTATGAGAAA
	I I I K F F * <i>entP</i> M R K
421	AAAATTATTTAGTTTAGCTCTTATTGGAATATTGGGTTAGTTGTGACAAATTTGGTACAAAAGTTGAT
	K L F S L A L I G I F G L V V T N F G T K V D
491	GCAGCTACGCGTTCATATGGTAATGGTGTATTATTGTAATAATAGTAAATGCTGGGTAACTGGGGAGAAG
	A ▲ A T R S Y G N G V Y C N N S K C W V N W G E
	S.D.
561	CTAAAGAGAATATTGCAGGAATCGTTATTAGTGGCTGGGCTTCTGGTTTGGCAGGTATGGGACATTAATA
	A K E N I A G I V I S G W A S G L A G M G H *
631	CTATGAAAAGTAATAATCTTTCAACAAAGTTCTAGAATTAAGTAAACAGCATTAGCCACCCGAGAAAT
	M K S N K S F N K V L E L T E T A L A T P E I
	<i>entiP</i>
701	TAAAAAAGATAAAAAATCTATGTGAAATTTTAGAAAAAGTAAAGCTAGTGCTGCTAAAGGTGAATTTTAT
	K K D K N L C E I L E K V K A S A A K G E F Y
771	TATGATTACAAGAAAGATTTCACCTGCAATTAGTGGATTCACTATTAGAAACGGCTTTTCCACACCGA
	Y D Y K K E F Q P A I S G F T I R N G F S T P
841	AGGTTTATTGGAGTTGCTTGCTGAAGTAAAAACTCCCAAAGCATGGTCGGGACTTTGAGTTATGATAAG
	K V L L E L L A E V K T P K A W S G L *
	-35 -10 S.D.
911	TGCCATTCTATTTTTTTGTAAGAGTATCTAATTGAGTTTAAAGGAACATATGGAATATAGAAATTAAGATG
	<i>orf4</i> M
981	TTACAATATATTTGGATAGTACAAATCAAAGAGAGGTCGTTTCGTCAAAAGAACGGCTTCTTTTATGG
	L N Y I W I V Q I K R E V V R Q K N G F F F M
1051	AAAAATGAGCGAGTATAATCTTCGGATCTTGTATGATTAGCAAAAGTTACTGTTGAACAAAGTGTTCATA
	E K *
1121	AAATCAGGCATTTCTGGACACTACATTTTCTACCTTAAATTTGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAA
1191	TCCCCAGCCC 1200

**Fig. 3.8. Secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina P (*entP*), de su hipotético gen de inmunidad (*entiP*) y de las regiones adyacentes.** La secuencia de los 995 primeros nucleótidos se obtuvo de Casaus (1998). En color rojo se muestra la nueva secuencia nucleotídica obtenida en *E. faecium* G16 y en color verde, el hipotético péptido codificado por *orf4*. Las regiones -10 y -35 del promotor de la transcripción y las regiones Shine-Dalgarno (S.D.) aparecen subrayadas. Las secuencias repetidas directas (SRD) e inversas (SRI) derechas (d) e izquierdas (i) aparecen en cursiva y subrayadas. Los codones de terminación de la traducción se indican con el símbolo \*. El punto de procesamiento de la bacteriocina está señalado con una flecha vertical. El código genético y las abreviaturas de los aminoácidos se muestran en el Apéndice 2.

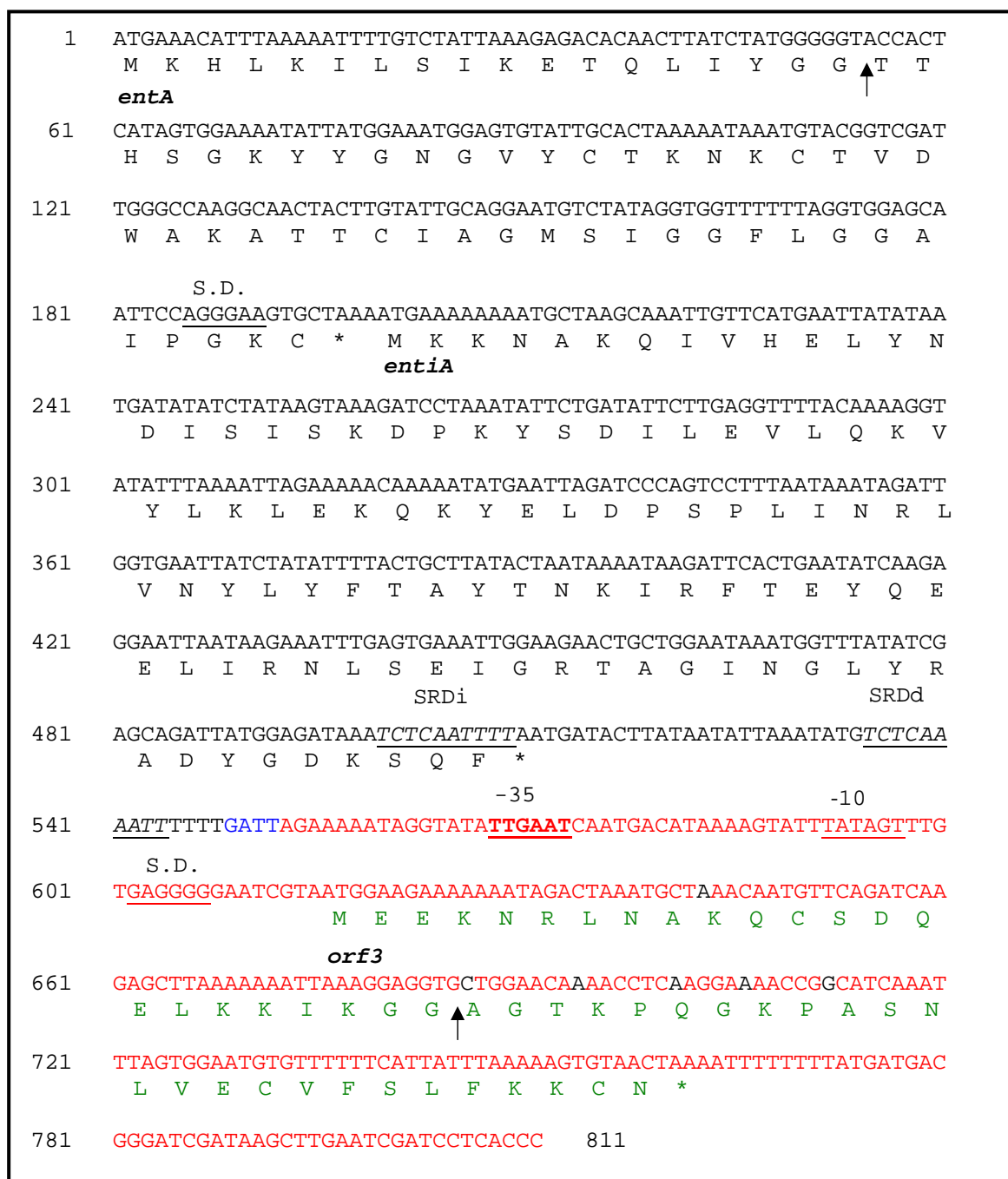
Otra estrategia seguida para el avance hacia el extremo 3' en el operón de la enterocina P de *E. faecium* G16 fue la realización de un PCR anidado. Para ello, se realizó una primera reacción de amplificación con la mezcla de ligación *Dra*I y la pareja de cebadores externos LP6 y TH8. El producto obtenido de esta reacción sirvió como molde para una nueva amplificación con la pareja de cebadores internos LP5 y SK2, obteniéndose un producto de aproximadamente 500 pb que se purificó y secuenció con los cebadores LP5 y SK2. La secuencia obtenida constó de 452 pb y, si bien no proporcionó información adicional sobre el operón de la enterocina P, permitió confirmar la secuencia adyacente a *entiP* obtenida con el PCR hemiespecífico anterior.

### III.3.9.2. Avance de la secuenciación hacia el extremo 5' del DNA de *E. faecium* G16

Para obtener información acerca de la secuencia nucleotídica localizada delante de *entP* en *E. faecium* G16, se realizó un PCR hemiespecífico con la mezcla de ligación *Dra*I y los cebadores LP7 y SK2. El producto de PCR obtenido, con un tamaño ligeramente superior a 500 pb, se purificó y se procedió a su secuenciación. No obstante, no se pudo determinar su secuencia nucleotídica debido al gran número de incertidumbres encontrado.

### III.3.9.3. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3' del DNA de *E. faecium* P21

Cuando se realizó un PCR hemiespecífico con los cebadores TH10 y SK2 a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con el DNA de *E. faecium* P21 y los enzimas *Dra*I, *Eco*RV o *Hinc*II y ligados en el vector pBluescript II SK+, se obtuvieron varios productos de distinto tamaño molecular con las mezclas de ligación *Dra*I y *Hinc*II; en cambio, la mezcla de ligación *Eco*RV proporcionó un único producto de PCR de tamaño superior a 500 pb, que se purificó y secuenció con los cebadores TH10 y SK2. La secuencia obtenida a partir de este producto de PCR constó de 784 pb (Fig. 3.9), de las cuales 171 pb correspondieron a una parte de *entA*, y 312 pb al gen de la proteína de inmunidad de la enterocina A (*entiA*), con 1 nucleótido de separación en la región intergénica (Aymerich *et al.*, 1996). El análisis del resto de la secuencia adyacente a *entiA* de *E. faecium* P21 (300 pb) permitió identificar las regiones -10 (TATAGT) y -35 (TTGAAT) del hipotético promotor de la transcripción separadas por 19 pb, lo que se aproxima a la distancia óptima de  $17 \pm 1$  pb, y la región Shine-Dalgarno (S.D.) (GAGGGG) localizada a una distancia de 5 pb del codon de iniciación de la traducción ATG. Asimismo, en la región del promotor, por delante de la región -35, se identificaron las secuencias repetidas directas (SRD) izquierda



**Fig. 3.9. Secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina A (*entA*), del gen de su hipotética proteína de inmunidad (*orf2* o *entiA*) y de la región adyacente a éste.** La secuencia de los 27 primeros nucleótidos se obtuvo de Aymerich *et al.* (1996). En color rojo se muestra la nueva secuencia nucleotídica obtenida en *E. faecium* P21 y en color verde, el hipotético péptido codificado por *orf3*. El código genético y las abreviaturas de los aminoácidos se muestran en el Apéndice 2. Resto de símbolos como en la Fig.3.8.

(TCTCAATTTT) y derecha (TCTCAAAATT) separadas por 25 pb. A una distancia de 104 pb por detrás del codon de terminación de la traducción de la proteína de inmunidad se detectó un marco de lectura abierto, *orf3*, que codifica una proteína de 48 aminoácidos (ORF3) con una secuencia líder del tipo doble glicina de 23 aminoácidos en su extremo N-terminal. La comparación de la secuencia aminoacídica de ORF3 con las secuencias de otras proteínas de las bases de datos reveló que se trataba del factor de inducción de la enterocina A (EntF), descrito en *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998) y en *E. faecium* DPC1146 (O'Keeffe *et al.*, 1999); EntF presentó una identidad del 41% con el factor de inducción de la carnobacteriocina B2 de *Cb. piscicola* LV17b (Quadri *et al.*, 1997) y del 34% con el hipotético péptido inductor ORF4 de *Lb. sakei* Lb706 (Axelsson *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 1996).

#### III.3.9.4. Avance de la secuenciación hacia el extremo 3' del DNA de *E. faecium* P21

Con el objeto de determinar la secuencia localizada delante de *entB*, se empleó la técnica de PCR hemiespecífico con la pareja de cebadores ENTB5 y SK2 y los fragmentos resultantes de digerir el DNA de *E. faecium* P21 con los enzimas *DraI*, *EcoRV* o *HincII* y ligados en el vector pBluescript SK II +. No obstante, no fue posible obtener ningún producto de PCR.

#### III.3.9.5. Estudio de la presencia de genes estructurales que codifiquen bacteriocinas del tipo pediocina distintas de las enterocinas P y A

Durante la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se obtuvieron, para cada una de las cepas, distintas fracciones cromatográficas en función de su tiempo de retención en la columna de fase inversa. Con la excepción de la fracción G, obtenida a partir de *E. faecium* P21, y de la fracción B, cuyo extremo N-terminal estaba bloqueado para la secuenciación por el método de Edman, las fracciones secuenciadas contenían la secuencia aminoacídica YGNGVY en su región N-terminal. Una vez confirmada la presencia de *entP* en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 y de *entA* en *E. faecium* P21, se procedió a la búsqueda en estas cepas de genes que codificaran otras bacteriocinas distintas, pero que, al igual que las enterocinas P y A, contuvieran la secuencia aminoacídica YGNGVY. Para ello, se digirió el DNA total de cada una de las cepas con enzimas de restricción, se ligaron los fragmentos obtenidos en el vector pBluescript II SK +, y se realizaron diversas reacciones de amplificación mediante la técnica de PCR hemiespecífico, empleando el cebador CH1, cuyo diseño

se esquematiza en la Fig.3.10, y el cebador SK2, que posee una secuencia complementaria a la del fagémido.

Los productos de PCR obtenidos con los cebadores CH1 y SK2 y las mezclas de ligación *EcoRV* y *RsaI* en *E. faecium* AA13, y *DraI*, *EcoRV* y *RsaI* en *E. faecium* G16 fueron los siguientes:

- 1) Empleando el DNA de *E. faecium* AA13 se obtuvieron un producto de tamaño ligeramente superior a 500 pb con la mezcla de ligación *EcoRV* y dos productos, uno de tamaño ligeramente superior y otro ligeramente inferior a 500 pb, con la mezcla de ligación *RsaI*.
- 2) Empleando el DNA de *E. faecium* G16 se obtuvieron dos productos de cada una de las mezclas de ligación *DraI*, *EcoRV* y *RsaI*. Con *DraI* se obtuvo un producto de un tamaño superior a 500 pb y otro de, aproximadamente, 400 pb; con *EcoRV* se obtuvo un producto de alrededor de 1.600 pb y otro de tamaño ligeramente superior a 500 pb y coincidente con el menor de los obtenidos en *E. faecium* AA13; finalmente, con *RsaI* se obtuvo un producto de un tamaño ligeramente inferior a 500 pb, coincidente con el obtenido en *E. faecium* AA13, y otro de alrededor de 350 pb. Los productos de menor tamaño obtenidos con las mezclas de ligación *DraI* y *EcoRV* se extrajeron del gel, se purificaron y secuenciaron empleando los cebadores CH1 y SK2. Sin embargo, no se pudo determinar la secuencia nucleotídica correspondiente a dichos productos.

Los productos de PCR obtenidos con las mezclas de ligación *EcoRV* y *HincII* de *E. faecium* P21 y los cebadores CH1 y SK2 fueron los siguientes:

- 1) Un producto único a partir de la mezcla de ligación *EcoRV*, de un tamaño superior a 500 pb.
- 2) Dos productos a partir de la mezcla de ligación *HincII*: uno mayoritario de alrededor de 500 pb y otro de, aproximadamente, 350 pb.

El producto obtenido con *EcoRV* y el producto mayoritario de *HincII* (extraído a partir del gel) se purificaron para determinar su secuencia nucleotídica. Aunque las concentraciones de los productos tras su extracción y purificación fueron muy pequeñas, éstos se secuenciaron con los cebadores CH1 y SK2; sin embargo, no se pudo obtener su secuencia nucleotídica.

		1	5	10											
Fracción A ( <i>E. faecium</i> AA13)		A	T	R	S	Y	G	N	G	V	Y				
		1	5	G	10										
Fracción C ( <i>E. faecium</i> G16)		G	T	R	X	Y	X	N	G	V	Y				
		1	5	10											
Fracción D ( <i>E. faecium</i> G16)		A	T	R	S	Y	G	N	G	V	Y				
		1	5	10											
Fracción E ( <i>E. faecium</i> P21)		A	P	H	G	X	K	Y	Y	G	N	D	G	V	Y
		1	5	10											
Fracción F ( <i>E. faecium</i> P21)		E	N	D	S	G	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	

Fragmento seleccionado		Y	G	N	G	V	Y	
RNA <sub>m</sub>	5'	UAU	GGU	AAU	GGU	GUU	UAU	3'
		C	C	C	C	C	C	
			A		A		A	
			G		G		G	
DNA <sub>c</sub>	3'	AUA	CCA	UUA	CCA	CAA	AUA	5'
		G	G	G	G	G	G	
			A		A		A	
			G		G		G	
Cebador CH1	5'	TAY	GGI	AAY	GGI	GTI	TAY	TG 3'

**Fig. 3.10. Diseño del cebador degenerado CH1 a partir de la secuencia aminoacídica de las fracciones A, C, D, E y F.** En cada una de las fracciones se indican en color rojo los aminoácidos que forman parte de la secuencia consenso de las bacteriocinas del tipo pediocina (clase IIa). Y representa a los desoxinucleótidos C y T, e I a la base universal inosina. El código genético y las abreviaturas de los aminoácidos se muestran en el Apéndice 2.

## III.4. DISCUSIÓN

### III.4.1. PRODUCCIÓN DE ENTEROCINAS DE AMPLIO ESPECTRO POR CEPAS DE *E. faecium* AISLADAS DE LOS ALIMENTOS

#### III.4.1.1. Aislamiento e identificación de *E. faecium* aislados de los alimentos y otras fuentes. Potencial patógeno del género *Enterococcus*

Las cepas AA13, G16 y P21 se aislaron de chorizos caseros elaborados en Cáceres, Segovia y León, respectivamente, y se identificaron a nivel de género y especie (Casaus, 1998). La identificación preliminar de las cepas como *Enterococcus faecium* se realizó mediante diversas pruebas bioquímicas y morfológicas empleadas habitualmente para las bacterias lácticas, así como mediante las pruebas clásicas propuestas por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) y por Devriese *et al.* (1993) para el género *Enterococcus*. Devriese *et al.* (1995) proponen que los microorganismos Gram-positivos, de morfología cocoide, catalasa negativos, capaces de crecer en presencia de una concentración de NaCl del 6,5% (p/v) y en medios con azida de sodio al 0,04% (p/v) pueden identificarse presuntivamente como miembros del género *Enterococcus*. Asimismo, las pruebas de fermentación de la ribosa y de Voges-Proskauer resultan útiles en la asignación del género, pues la práctica totalidad de las especies de enterococos son positivas a ambas.

No obstante, debido a la heterogeneidad de las especies que componen el género *Enterococcus* no se puede establecer un criterio fenotípico definido que permita su diferenciación inequívoca (Devriese *et al.*, 1993). De hecho, se pueden aislar con relativa frecuencia cepas atípicas (Giraffa *et al.*, 1997). Actualmente existen diversos métodos moleculares que permiten clasificar taxonómicamente una cepa, así como establecer su posición filogenética con respecto a otras bacterias. A este respecto, el análisis del rRNA 16S resulta apropiado debido a que contiene en su secuencia regiones tanto poco como muy conservadas (Axelsson, 1998). Otras aproximaciones son la hibridación con sondas dirigidas al rRNA 23S (Betzl *et al.*, 1990), el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del DNA y del rRNA (Hall *et al.*, 1992), el análisis del patrón electroforético de proteínas totales (Pot *et al.*, 1994) y el análisis de las secuencias intergénicas de las regiones espaciadoras 16S-23S y 23S-5S del rRNA (Naïmi *et al.*, 1997, 1999). La comparación de los patrones electroforéticos de proteínas totales de las cepas AA13, G16 y P21 con los de cepas de referencia de una base de datos de más de 7.000 bacterias lácticas, permitió, de acuerdo con los

resultados de Kersters y de Ley (1975) y Pot *et al.* (1993), su asignación taxativa a una especie. Las cepas AA13 y G16 se clasificaron como *E. faecium*-atípico y la cepa P21 como *E. faecium*.

Entre las cepas comparadas, se encuentran *E. faecium* L50, *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136, productoras de las enterocinas L50, P y Q (Cintas *et al.*, 1998b; Cintas *et al.*, 2000b), de la enterocina P (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998) y de las enterocinas A y B (Casaus *et al.*, 1997; Casaus, 1998), respectivamente. De acuerdo con la posición filogenética de las cepas bacteriocinogénicas de *E. faecium* comparadas, se pueden establecer dos grupos de similitud: (i) *E. faecium* T136 y *E. faecium* P21, con una homología del 93%; y (ii) *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P13, con una homología del 89%. Los grupos (i) y (ii) presentan una homología entre sí del 82%. Por otra parte, el grupo *E. faecium* T136/*E. faecium* P21 muestra una similitud del 87% con *E. faecium* L50, mientras que en el grupo *E. faecium* P13/*E. faecium* AA13/*E. faecium* G16 dicha similitud disminuye al 82%.

El aislamiento de cepas de *E. faecium* de embutidos crudos curados, como el chorizo, el salchichón y el salami, ha sido descrito por varios investigadores (Samelis *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Lyon *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998). *E. faecium* forma parte de la flora típica de los productos cárnicos fermentados (Aymerich *et al.*, 1998), en los que también se encuentran bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus* (Schillinger y Lücke, 1989; Rodríguez, 1991; Sobrino *et al.*, 1991; Hugas *et al.*, 1993; Vignolo *et al.*, 1993; Cintas, 1995; Casaus, 1998), *Pediococcus* (Moreira 1993; Cintas, 1995; Casaus, 1998), y *Lactococcus* (Cintas, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995b; Casaus, 1998). Por otra parte, también se han aislado microorganismos de la especie *E. faecium* de una gran variedad de sustratos, tales como quesos (Farias *et al.*, 1994; Giraffa *et al.*, 1994; Olasupo *et al.*, 1994; Vlaenmyck *et al.*, 1994; Ennahar *et al.*, 1998), aceitunas (Floriano *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 1996), ensilados (Vlaenmyck *et al.*, 1994; Ohmomo *et al.*, 2000), contenido ruminal de diversas especies de rumiantes (Lauková *et al.*, 1993; Lauková, 1996), heces de mamíferos (Arihara *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993; Lauková y Czikková, 1998, Lauková *et al.*, 1998) y de aves (Audisio *et al.*, 1999) y aguas residuales (Lauková y Juris, 1997). En suma, se considera que los enterococos forman parte de la flora habitual del tracto intestinal de la especie humana y de algunos animales, y su capacidad para crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, como temperatura, pH o concentración de sal, posibilita una distribución prácticamente ubicua del género *Enterococcus* (Hardie y Whiley, 1997).

Actualmente, no existe un consenso acerca del potencial patógeno de los enterococos presentes en los alimentos (Giraffa *et al.*, 1997), aunque, hasta la fecha, no se ha demostrado que los enterococos de origen alimentario estén involucrados en infecciones clínicas humanas. La



participación de algunas bacterias lácticas en infecciones clínicas humanas, especialmente de tipo nosocomial, ha sido objeto de estudio por diversos investigadores (Aguirre y Collins, 1993; Adams y Marteau, 1995). No obstante, existen multitud de alimentos que contienen enterococos de forma natural o intencionada y que han sido consumidos históricamente de forma segura. De hecho, los enterococos, particularmente *E. faecium*, se han utilizado como cultivos iniciadores del queso *Cheddar* (Tamine, 1990) y *Mozarella* (Parente *et al.*, 1989), como probióticos (Fuller, 1989; Gilliland, 1990) y como inóculos para ensilados (Jones *et al.*, 1991). Aunque estos microorganismos no gozan en la actualidad de la denominación GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe* o Reconocidos Generalmente como Seguros), no existen estudios sistemáticos sobre el potencial patógeno de los enterococos aislados de los alimentos (Giraffa *et al.*, 1997). Si bien uno de los principales riesgos asociados al género *Enterococcus* consiste en su gran capacidad para intercambiar material genético extracromosómico con genes que codifican resistencia a antibióticos, especialmente a vancomicina, (Clewell, 1990), no se han detectado enterococos con resistencia múltiple a antibióticos procedentes de alimentos (Aguirre y Collins, 1993). Giraffa *et al.* (1997) consideran que los miembros del género *Enterococcus* poseen una aplicación en la industria láctea; no obstante, debido a que el potencial patógeno o la resistencia a antibióticos parecen ser características dependientes de la fuente de procedencia o incluso de la cepa, debe hacerse una selección cuidadosa de los microorganismos del género *Enterococcus* que pretendan emplearse en la industria alimentaria. A este respecto, resulta de especial utilidad comprobar la ausencia de actividad hemolítica en las cepas de interés, pues se ha demostrado que dicha actividad está asociada frecuentemente con la virulencia de los enterococos (Moellering *et al.*, 1992).

#### **III.4.1.2. Espectro de acción, inmunidad y actividad antimicrobiana cruzada de las bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

Las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 mostraron un espectro de acción amplio, pues inhibieron a bacterias lácticas y a otros microorganismos Gram-positivos patógenos o alterantes de los alimentos. (Tabla III.3, sección III.3.1). Los sobrenadantes de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 resultaron menos potentes que el sobrenadante de *E. faecium* P21 en la inhibición de las bacterias lácticas utilizadas como indicadores. El hecho de que estas cepas presenten escasa actividad inhibidora frente a bacterias lácticas de utilidad tecnológica en la industria alimentaria (como, por ejemplo, *Lb. casei*, *Lb. fermentum* o *Lb. plantarum*) pero una actividad antimicrobiana potente frente a

microorganismos alterantes y/o patógenos, una característica típica de muchas bacteriocinas producidas por *Enterococcus* spp. (Parente y Hill, 1992a; Giraffa, 1995; Callewaert *et al.*, 2000), es una propiedad interesante a la hora de proponer el empleo de dichas cepas, o de sus sustancias antimicrobianas, como bioconservantes en la industria alimentaria.

El espectro de acción de las enterocinas caracterizadas hasta la fecha es variable; no obstante, incluso aquellas con un espectro de acción reducido son activas frente a otros miembros del género *Enterococcus* y *Listeria* (Tabla II.4, sección II.2.3.). La producción de sustancias con actividad antimicrobiana frente a microorganismos susceptibles de colonizar los mismos nichos ecológicos que los microorganismos productores permitiría a éstos competir de forma más eficaz por los sustratos en los que se encuentran (Axelsson, 1998). En este sentido, se ha observado que *Listeria* y *Enterococcus* están estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético y se aíslan a menudo de las mismas localizaciones ambientales (Stackebrandt y Teuber, 1988; McKay, 1990), lo que podría explicar que la capacidad de inhibir al género *Listeria* sea una característica común entre los miembros del género *Enterococcus* (Parente y Hill, 1992a,b; Giraffa, 1995). La transmisión de *Ls. monocytogenes* mediante los alimentos constituye una seria amenaza para la Salud Pública. Datos epidemiológicos recientes indican que *Ls. monocytogenes* es un patógeno emergente causante de toxiinfecciones clínicas (Janda y Abbott, 1999). En este contexto, el empleo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, y particularmente el de las enterocinas, ha sido propuesto como un método “natural” para controlar la presencia y el desarrollo de este patógeno en los alimentos (Parente y Hill, 1992b; Giraffa *et al.*, 1994; Giraffa, 1995; Muriana, 1996; Lauková *et al.*, 1999; Aymerich *et al.*, 2000b,c). La capacidad de inhibir a microorganismos del género *Listeria* no es exclusiva del género *Enterococcus*; las bacteriocinas nisina (Nettles y Barefoot, 1993) y pediocina PA-1 (Pucci *et al.*, 1988), entre otras, poseen una potente actividad anti-*Listeria*; no obstante, dichas bacteriocinas presentan el inconveniente de que su actividad antagonista se extiende también a bacterias utilizadas en la industria láctea como cultivos iniciadores (Parente y Hill, 1992b). Además del efecto inhibidor frente a bacterias Gram-positivas, existen enterocinas que, en combinación con otros agentes como el EDTA o el ácido láctico, son activas frente a microorganismos Gram-negativos (Audisio *et al.*, 1999) o ejercen actividad antiviral (Wachsman *et al.*, 2000).

Una de las características de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas es la inmunidad frente a sus propias bacteriocinas (Jack *et al.*, 1995; Ennahar *et al.*, 2000). Esta observación presenta una gran utilidad práctica durante la caracterización bioquímica preliminar de las bacteriocinas, pues permite hipotetizar que: (i) una cepa sensible a la bacteriocina de otra no produce dicha bacteriocina

y (ii) si dos cepas productoras no se inhiben entre sí pueden producir la misma bacteriocina, o bien, ser resistentes de forma natural a las bacteriocinas heterólogas.

La similitud del espectro de actividad antimicrobiana de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P13, por un parte, y de *E. faecium* P21 y *E. faecium* T136, por otra, su inmunidad y los resultados de su actividad antimicrobiana cruzada, permitieron hipotetizar que *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 producen la enterocina P (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998) y que *E. faecium* P21 produce las enterocinas A y B (Casaus *et al.*, 1997; Casaus, 1998). Esta observación podría estar relacionada con la alta correlación filogenética observada al analizar los patrones electroforéticos de proteínas totales de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P13 (89% de similitud), por una parte, y de *E. faecium* P21 y *E. faecium* T136 (93% de similitud), por otra. No obstante, estos resultados no permitían descartar totalmente que *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 produjesen una o más bacteriocinas distintas de la enterocina P que no inhibieran a *E. faecium* P13, y que las bacteriocinas de *E. faecium* P21 fueran diferentes de las enterocinas A y B y no inhibieran a *E. faecium* T136.

### **III. 4.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 Y *E. faecium* P21**

#### **III.4.2.1. Estabilidad físico-química de las sustancias antimicrobianas exocelulares producidas por *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se eliminó por completo tras su tratamiento con los enzimas proteolíticos tripsina, papaína, pepsina y proteasa II, mientras que no resultó afectada por la actividad de la  $\alpha$ -amilasa y la lipasa I. La susceptibilidad de las diversas enterocinas a la acción de los enzimas proteolíticos es variable. Así, por ejemplo, las enterocinas L50A y L50B de *E. faecium* L50 y la enterocina P de *E. faecium* P13 se inactivan por tratamientos con tripsina, pepsina, papaína y las proteasas VI y XIV (Cintas 1995; Casaus, 1998); sin embargo, las enterocinas JBL1061, JBL1083 y JBL1531, producidas por las cepas de *E. faecium* homónimas (Arihara *et al.*, 1993), y la enterocina A producida por *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996), resisten la acción de la pepsina, mientras que la enterocina 100 de *E. faecium* 100 no se inactiva en presencia de los enzimas papaína, pepsina, pancreatina y tripsina (Kato *et al.*, 1993).

La anulación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 por la acción de diversos enzimas proteolíticos y su resistencia al tratamiento con enzimas glucolíticos y lipolíticos sugiere que dicha actividad se debe a la producción y secreción al medio exocelular de una sustancia de naturaleza proteica que no requiere para su actividad biológica componentes glucídicos ni lipídicos. La naturaleza proteica y la inmunidad de las células productoras (sección III.4.3), son dos criterios propuestos para la definición del término “bacteriocina” (Montville y Kaiser, 1993), ya que todas las bacteriocinas descritas se inactivan por la acción de, al menos, un enzima proteolítico (Piard y Desmazeaud, 1992). En este contexto, el hecho de que las cepas productoras fueran inmunes a sus propias sustancias antimicrobianas (ver sección anterior) y que el tratamiento de los sobrenadantes con distintos enzimas proteolíticos anulara su actividad era indicativo de que la actividad antimicrobiana de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se debía a la producción y liberación al medio exocelular de bacteriocinas. La inactivación de las bacteriocinas por enzimas proteolíticos es un hecho a considerar en la aplicación de las mismas como bioconservantes en la industria alimentaria: por una parte, presenta la desventaja de que éstas pueden inactivarse en el alimento por la acción de las proteasas presentes en el mismo (Nettles y Barefoot, 1993); por otra, la acción de enzimas gástricos (pepsina) y pancreáticos (tripsina, pancreatina) asegura su degradación en el tracto gastrointestinal, por lo que no afectarían a la ecología microbiana de dicho nicho ecológico, y, adicionalmente, se evitarían los peligros asociados a muchos antibióticos (Piard y Desmazeaud, 1992b).

Las bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 son estables en un amplio intervalo de pH (2-11). En general, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son estables a valores de pH ácidos o neutros, en consonancia con los ambientes en los que estos microorganismos se desarrollan (Piard y Desmazeaud, 1992b). Una excepción a este comportamiento es la nisina, cuya solubilidad disminuye drásticamente a valores de pH mayores de 2 (Hurst, 1981). La estabilidad de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 en un intervalo amplio de pH representa una ventaja tecnológica, pues permitiría su aplicación en diversos productos alimenticios, independientemente de su pH. Así, por ejemplo, se ha propuesto el empleo de enterocinas para disminuir el desarrollo de *Ls. monocytogenes* en la corteza de los quesos duros, productos en los que, durante el proceso de maduración, se produce un incremento de pH que compromete la actividad de la nisina (Giraffa *et al.*, 1995).

Las bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 son estables después de diversos tratamientos térmicos a temperaturas elevadas, lo que sugiere que la actividad

antimicrobiana está mediada por una molécula proteica sencilla, probablemente carente de estructura terciaria. Al igual que la estabilidad a diversos valores de pH, esta propiedad resulta apropiada para el empleo de estas sustancias como bioconservantes en la industria alimentaria, puesto que resistirían los tratamientos térmicos a los que se someten ciertos alimentos.

De acuerdo con la clasificación de las bacteriocinas propuesta por Nes *et al.* (1996), las bacteriocinas de *E. faecium* en estudio pertenecerían a la clase I ó II, compuestas por péptidos de pequeño tamaño molecular que, entre otras características, presentan resistencia a los tratamientos térmicos elevados.

#### **III.4.2.2. Evaluación de los medios de cultivo MRS, BHI y APT para la producción/detección de las sustancias antimicrobianas exocelulares de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21**

Los medios de cultivo seleccionados para evaluar el crecimiento de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 y la producción de sus bacteriocinas fueron medios de composición compleja (MRS, APT y BHI). Dichos medios contienen concentraciones considerables de péptidos de un tamaño molecular comprendido en el rango de las bacteriocinas de las clases I y II (3.000-6.000 Da) que pueden interferir con el proceso de purificación (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). No obstante, su empleo está justificado porque el crecimiento de los microorganismos productores en medios de composición semidefinida conduce, en la mayoría de los casos, a la disminución de la producción de la bacteriocina en comparación con la obtenida en medios complejos (Yang y Ray, 1994; Dallas *et al.*, 1996).

La producción/detección de las bacteriocinas de las cepas *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 cultivadas a 32°C durante 16 h fue máxima en el caldo MRS, y ligeramente menor en el caldo APT. Ambos medios son muy ricos en nutrientes e incluyen en su composición glucosa, hidrolizados proteicos, extracto de levadura, diversas sales minerales que aportan cationes divalentes, como el sulfato magnésico y el sulfato de manganeso, y agentes tensioactivos (Tween 80 en el MRS y monooleato de sorbitán en el APT). En este contexto, Casaus (1998) observó que cuando *E. faecium* P13, productor de la enterocina P, crecía en medio APT, se detectaba el 50% de la actividad antimicrobiana obtenida en caldo MRS. Las causas de esta disminución de la producción/detección de la actividad antimicrobiana podrían ser: (i) el pH inicial del medio (6,7 en APT frente a 6,2 en MRS); (ii) el cloruro sódico presente en APT (ausente en MRS); y/o (iii) la presencia de monooleato de sorbitán como agente tensioactivo en lugar de Tween 80.

La producción y/o detección de las bacteriocinas cuando las tres cepas se cultivaron en caldo BHI fue considerablemente menor que en los caldos MRS y APT, a pesar de que el crecimiento microbiano no difirió significativamente en los tres caldos. El caldo BHI contiene una menor concentración de glucosa y una mayor concentración de hidrolizados proteicos que los caldos MRS y APT, y, además, carece de cationes divalentes y de agentes tensioactivos. Otra diferencia importante con respecto a los otros dos caldos ensayados es el pH inicial del medio, siendo más elevado en el caldo BHI (7,4) que en los caldos MRS y APT. Todos estos factores podrían influir negativamente en la producción, secreción y/o actividad de las bacteriocinas cuando las cepas productoras crecen en el caldo BHI. Al igual que en este trabajo, diversos investigadores han utilizado el MRS como medio de cultivo para el crecimiento de *Enterococcus* y la producción de enterocinas (Arihara *et al.*, 1993; Vlaemynck *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Franz *et al.*, 1996; Casaus, 1998) y de otras bacteriocinas de las bacterias lácticas (Muriana y Klaenhammer, 1987; Holck *et al.*, 1992; Sobrino *et al.*, 1992; Tichaczek *et al.*, 1992; Daba *et al.*, 1993; Moreira, 1993; Cintas, 1995).

Una vez seleccionado el medio MRS, se determinó la cinética de crecimiento y producción de bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 en dicho caldo. Los recuentos máximos obtenidos en las tres cepas fueron del orden de  $10^9$  ufc/ml a las 12 h, tras lo que disminuyeron y se estabilizaron en torno a  $10^8$  ufc/ml. El cese del crecimiento de los cultivos podría deberse al agotamiento de ciertos “factores limitantes del crecimiento”, como azúcares, vitaminas u otros compuestos nitrogenados (Piard y Desmazeaud, 1992b).

En lo que se refiere a la actividad antimicrobiana, los valores máximos se detectaron entre las 12 y las 18 h, lo que corresponde al final de la fase exponencial y al principio de la fase estacionaria del crecimiento, respectivamente. En general, la síntesis de bacteriocinas tiene lugar al final de la fase exponencial de crecimiento (Piard y Desmazeaud, 1992b), por lo que se consideran metabolitos primarios o asociados al crecimiento. Diversos autores han sugerido que la producción de bacteriocinas está estrechamente relacionada con la biomasa alcanzada por el cultivo (De Vuyst y Vandamme, 1992; Yang y Ray, 1994; Krier *et al.*, 1998); no obstante, la relación existente entre la cinética de crecimiento y la producción de bacteriocinas no se conoce con exactitud, ya que se ha observado que variaciones en las condiciones nutricionales y/o ambientales de cultivo de un microorganismo que no afectan al crecimiento pueden afectar a su producción de bacteriocinas (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; Casaus, 1998). Por otra parte, la reducción de la actividad antimicrobiana observada una vez alcanzado el valor máximo, podría deberse a la degradación de las bacteriocinas por las proteasas liberadas al medio exocelular por el microorganismo productor,

y/o a su adsorción a las células productoras a medida que aumenta la biomasa del cultivo (sección IV.4.2.4).

El pH final alcanzado por los cultivos de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 osciló entre 4,0 y 4,3. Los miembros del género *Enterococcus* presentan un metabolismo homofermentativo, con la producción del isómero L (+) del ácido láctico como principal producto de la fermentación de los carbohidratos (Holt *et al.*, 1994; Hardie y Whiley, 1997). El ácido láctico es un metabolito tanto primario como secundario que desempeña un papel higiénico y tecnológico en los alimentos fermentados y que ejerce una acción antimicrobiana sinérgica con las bacteriocinas (Vandenbergh, 1993; Giraffa *et al.*, 1994; Audisio *et al.*, 1999).

### **III.4.2.3. Purificación a homogeneidad de las bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21. Determinación de su secuencia aminoacídica**

La purificación a homogeneidad de las bacteriocinas es un requisito imprescindible para asegurar su naturaleza proteica, así como para determinar su secuencia aminoacídica y compararla con la de bacteriocinas conocidas (Aymerich *et al.*, 2000a; Cintas *et al.*, 2000c). La purificación de las bacteriocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 se realizó empleando una modificación (Cintas *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1998a) de la técnica propuesta por Nissen Meyer *et al.* (1992a). Una gran variedad de bacteriocinas producidas por diversos géneros de bacterias lácticas se ha purificado utilizando una metodología que incorpora precipitación con sulfato amónico, cromatografías de intercambio catiónico y/o interacción hidrofóbica y, finalmente, cromatografía en fase inversa (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995,1998a; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Casaus, 1998).

La precipitación con sulfato amónico tiene como objetivo la concentración de las proteínas del sobrenadante de los cultivos productores. Otras estrategias son la precipitación con ácidos (Hastings *et al.*, 1991) o etanol (Venema *et al.*, 1997) y la extracción con solventes orgánicos (Piva y Headon, 1994). Dado que durante la precipitación, además de las bacteriocinas, coprecipitan un gran número de proteínas “contaminantes”, en su mayoría procedente del medio de cultivo, éstas deben eliminarse en etapas sucesivas del proceso de purificación. La precipitación de las proteínas de los sobrenadantes de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 permitió obtener, tras la centrifugación, tres fracciones bien diferenciadas: un precipitado, una película flotante y un sobrenadante. La presencia de una película flotante se ha observado durante la precipitación de otras bacteriocinas con sulfato amónico (Muriana y Klaenhammer, 1991; van Laack *et al.*, 1992;

Larsen *et al.*, 1993; Cintas *et al.*, 1995; Dallas *et al.*, 1996; Casaus, 1998) y, dado que puede llegar a contener hasta un 97% de la actividad antimicrobiana (Muriana y Klaenhammer, 1991), es necesario recogerla y mezclarla con el precipitado. La aparición de esta película superficial se ha atribuido a la presencia del agente surfactante Tween 80 en el medio de cultivo (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). El Tween 80 puede intervenir no sólo en el proceso de purificación, sino también, aunque de forma variable, en la producción y/o detección de la actividad antimicrobiana. Así, por ejemplo, la producción de la bacteriocina carnosina LA44a fue menor cuando *Lc. carnosum* LA44a se desarrolló en medio MRS sin Tween 80 (van Laack *et al.*, 1992), la suplementación con un 0,1% de Tween 80 produjo un incremento de 8 veces en la producción de mesentericina 5 por *Lc. mesenteroides* UL5 (Daba *et al.*, 1993) y la producción de las enterocinas A y B fue máxima en medio MRS suplementado, entre otros componentes, con Tween 80 (1%, v/v) (Aymerich *et al.*, 2000b). El incremento de la actividad antimicrobiana podría ser debido a: (i) el efecto del surfactante en la permeabilidad de la membrana celular, lo que aceleraría la difusión de la bacteriocina al medio exocelular; (ii) la disociación de los agregados (inactivos) de la bacteriocina; y (iii) el obstáculo para la adsorción de las bacteriocinas a las proteínas del medio de cultivo (Daba *et al.*, 1993). Por otra parte, la actividad antimicrobiana de la lactococcina G aumentó 10 veces cuando se añadió Tween 80 en el ensayo de actividad antimicrobiana (Nissen-Meyer *et al.*, 1992a), mientras que una concentración del 0,01% de Tween 80 redujo la actividad antimicrobiana de la pediocina A (Piva y Headon, 1994).

La cromatografía de filtración en gel es una técnica cromatográfica introducida con éxito en el proceso de purificación de algunas bacteriocinas (Sudirman *et al.*, 1994; Cintas, 1995; Martínez *et al.*, 1998; Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 1998a) con el objeto de eliminar las sales que interfieren negativamente en la cromatografía de intercambio catiónico. A pesar de ello, los rendimientos obtenidos para *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 tras el intercambio catiónico fueron bajos (1,6; 3,8 y 6%, respectivamente), lo que podría deberse a la débil naturaleza catiónica de las bacteriocinas o a su naturaleza hidrofóbica, que causaría su retención en las matrices cromatográficas, originando pérdidas del 40-80% durante las cromatografías de intercambio iónico (Venema *et al.*, 1997).

La recuperación de la actividad antimicrobiana tras la cromatografía de interacción hidrofóbica fue del 3,8; 5,9 y 5% en *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21, respectivamente, lo que representó en las dos primeras cepas una mayor recuperación que durante la cromatografía de intercambio catiónico. Este fenómeno también se ha observado en la purificación de otras bacteriocinas como, por ejemplo, la sakacina A (Holck *et al.*, 1992), la bavaricina A (Larsen *et al.*,



1993), la enterocina L50 (Cintas, 1995), la pediocina PA-1 (Cintas, 1995) y la enterocina P (Casaus, 1998).

Los rendimientos obtenidos durante la cromatografía en fase inversa oscilaron entre el 0,9% (fracción B) y el 25% (fracción D), lo que se encuentra dentro del rango de rendimientos citados en la bibliografía (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). De manera similar a lo observado tras la interacción hidrofóbica, la actividad de las fracciones A y D fue mayor que la obtenida en el paso cromatográfico anterior, un fenómeno que se ha descrito también durante la purificación de la enterocina A (Aymerich, 1996), la nisina A (Cintas *et al.*, 1998a) y la enterocina I (enterocina L50) (Floriano *et al.*, 1998). Dado que los incrementos de actividad antimicrobiana se han observado tras las cromatografías de interacción hidrofóbica, es posible que los medios apolares favorezcan la actividad biológica de la molécula. Otra posibilidad sería que durante el proceso de purificación se eliminaran moléculas que influyan negativamente en la actividad de la bacteriocina (Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 1998a).

La obtención de varias fracciones cromatográficas en las tres cepas analizadas (fracciones A y B en *E. faecium* AA13, fracciones C y D en *E. faecium* G16 y fracciones E, F y G en *E. faecium* P21) sugiere que cada cepa produce más de una bacteriocina, hecho que se ha descrito en muchas bacterias lácticas bacteriocinogénicas (Quadri *et al.*, 1994; Casaus *et al.*, 1997; Papathanosopoulos *et al.*, 1997; Anderssen *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 1998b; Cintas *et al.*, 2000b); no obstante, también existe la posibilidad de que las diferentes fracciones correspondan a una misma bacteriocina que haya sufrido diversas modificaciones bioquímicas, lo que explicaría las diferencias observadas en los perfiles de elución. En este contexto, Worobo *et al.* (1994) obtuvieron tres fracciones cromatográficas durante la purificación de la sustancia antimicrobiana producida por *Cb. piscicola* LV17A que resultaron corresponder a una única bacteriocina, denominada carnobacteriocina A, siendo una de las fracciones una forma oxidada de la bacteriocina y la otra una mezcla de las formas oxidada y no oxidada degradadas en su extremo C-terminal. Asimismo, Casaus (1998) obtuvo tres fracciones cromatográficas (A1, A2 y A3) durante la purificación de las sustancias antimicrobianas de *E. faecium* T136. La secuenciación aminoacídica de las fracciones mediante degradación de Edman mostró que la fracción A1 correspondía a la enterocina A, previamente descrita por Aymerich *et al.* (1996), que la fracción A3 contenía una nueva bacteriocina, denominada enterocina B y que la fracción A2 estaba formada por una mezcla de ambas bacteriocinas. Este parece ser el caso de las fracciones purificadas de *E. faecium* P21, ya que la secuencia aminoacídica de la fracción F sugiere que se trata de una mezcla de las fracciones E y G (Fig. 3.4, sección III.3.6).

La secuenciación aminoacídica mediante degradación de Edman de las fracciones procedentes de *E. faecium* AA13, permitió obtener una secuencia de 20 aminoácidos en la fracción A, mientras que no fue posible secuenciar la fracción B debido a que su extremo N-terminal estaba bloqueado para la degradación de Edman. Este bloqueo podría deberse a la existencia de residuos modificados como en el caso de los lantibióticos (Sahl y Bierbaum, 1998), a la modificación del aminoácido del extremo N-terminal, o a que el péptido retiene la metionina N-terminal en forma de formilmetionina (en el caso de que se trate de bacteriocinas que se sintetizan sin extensión N-terminal) (Cintas *et al.*, 1998b). La secuenciación de las fracciones C y D, procedentes de *E. faecium* G16, permitió obtener secuencias de 13 y 30 aminoácidos, respectivamente. A partir de las fracciones E y F, obtenidas de *E. faecium* P21, se obtuvieron secuencias de 30 y 20 aminoácidos, respectivamente. Todas estas fracciones tienen en común la presencia en su región N-terminal de la secuencia aminoacídica YGNGVY que forma parte de la secuencia consenso de las bacteriocinas de la clase IIa YGNGVXC (Nieto Lozano *et al.*, 1992; Aymerich *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000). Adicionalmente, las fracciones A y D poseían en su extremo N-terminal la secuencia aminoacídica ATRS, y la fracción C presentó la secuencia TR. El análisis de las secuencias aminoacídicas de las bacteriocinas de la clase IIa reveló que la enterocina P es la única bacteriocina de esta clase que posee la secuencia ATRS precediendo a la secuencia YGNGVY en el extremo N-terminal (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998), lo que permitió sugerir la producción de dicha enterocina por *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16. Por otra parte, la fracción E presentó en su extremo N-terminal, precediendo a la secuencia consenso, la secuencia aminoacídica HG. Dicha secuencia, junto con el desplazamiento de la secuencia consenso desde la posición 5 a la 8 del péptido, son características exclusivas de la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996). En cuanto a la fracción G, su secuencia resultó prácticamente idéntica a la de la enterocina B (Casaus *et al.*, 1997).

No obstante, la obtención de distintas fracciones cromatográficas puras con actividad antimicrobiana de cada una de las cepas evaluadas, junto con la imposibilidad de obtener una secuencia aminoacídica completa de las mismas, no permitió descartar que las cepas objeto de estudio produjeran otras bacteriocinas de la familia de la pediocina diferentes de las enterocinas P y A.

### III.4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA PARCIAL DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* AA13 Y *E. faecium* G16 Y DE LAS ENTEROCINAS A Y B DE *E. faecium* P21

Una vez purificadas a homogeneidad las enterocinas de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 y determinada su secuencia aminoacídica parcial se procedió a su caracterización genética para confirmar la presencia del gen estructural de la enterocina P en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 y de los genes de las enterocinas A y B en *E. faecium* P21, así como para determinar la posible presencia de genes estructurales de otras bacteriocinas de la clase IIa. Para ello, se aisló y visualizó el material genético de estas cepas y se determinó y analizó la secuencia nucleotídica de los determinantes genéticos que codifican la producción y/o inmunidad de dichas enterocinas.

El aislamiento del DNA total de *E. faecium* AA13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* P21 mediante el método de lisis alcalina de Anderson y McKay (1983) permitió identificar la presencia de plásmidos de 6,9 y 7,9 kb en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* P21, respectivamente; en cambio, en *E. faecium* G16 no se detectaron plásmidos. Dicho método de aislamiento de DNA permitió la visualización de plásmidos de 23 y 4 kb en *E. faecium* RZS C13 y *E. faecium* RZS C5, respectivamente (Vlaemynck *et al.*, 1994), de 50 y 7,2 kb en *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998b) y de 23 kb en *E. faecium* 6TI1a (Floriano *et al.*, 1998). Asimismo, Casaus (1998) empleó el método de lisis alcalina para el aislamiento del material genético de *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 y obtuvo un rendimiento de plásmidos de elevado tamaño molecular (> 60 kb) superior al conseguido con los métodos de Birnboim y Doly (1979) y Sambrook *et al.* (1989).

Casaus (1998) obtuvo mutantes de *E. faecium* P13 mediante el tratamiento de los cultivos con novobiocina. Los mutantes fueron deficientes en la producción de enterocina P y en la inmunidad a la misma, lo que sugirió que ambos fenotipos se hallaban ligados genéticamente. Dado que la cepa original y los mutantes presentaron un perfil plasmídico idéntico, que incluía un único plásmido mayor de 60 kb, no se pudo elucidar si los determinantes genéticos asociados a la producción e inmunidad de la enterocina P estaban localizados en el cromosoma o en este plásmido. Puesto que *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 carecen del plásmido de 60 kb observado en *E. faecium* P13 y que las tres cepas son productoras de enterocina P, es posible que los determinantes genéticos que codifican la producción y la inmunidad de esta bacteriocina se encuentren localizados en el cromosoma de las cepas productoras. Esta hipótesis está favorecida por la observación de que la producción de enterocina P y la inmunidad a la misma son dos fenotipos muy estables en *E. faecium* P13 (Casaus, 1998).

Por otra parte, el perfil plasmídico de *E. faecium* P21, que produce las enterocinas A y B, difirió del de *E. faecium* T136, productor de las mismas enterocinas, que posee un plásmido de tamaño superior a 60 kb (Casaus, 1998); en cambio, *E. faecium* CTC492, cepa productora de la enterocina A (Aymerich, 1996) y la enterocina B (Casaus, 1998), presentó un perfil plasmídico idéntico al de *E. faecium* T136. Los determinantes genéticos para la producción de enterocina A se han localizado en el cromosoma de *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996) y *E. faecium* DPC1146 (O'Keeffe *et al.*, 1999); asimismo, los determinantes genéticos para la producción de enterocina B se han localizado en el cromosoma de *E. faecium* BFE900 (Franz *et al.*, 1999). No obstante, se desconoce la posición relativa de los determinantes genéticos de ambas bacteriocinas, así como si su localización es la misma en todas las cepas productoras de las enterocinas A y B.

El análisis genético de cepas de *E. faecium* productoras de bacteriocinas ha permitido establecer la localización de los determinantes genéticos para la producción de ciertas enterocinas. Así, por ejemplo, la enterocina 01 está codificada en un plásmido de *E. faecium* NA01 de 21,5 kb y su hipotética proteína de inmunidad en uno de 23 kb o en el cromosoma (Olasupo *et al.*, 1994); las enterocinas L50 están codificadas en un plásmido de más de 50 kb (pCIZ1) (Cintas *et al.*, 1998b), la enterocina I (enterocina L50A) y su proteína de inmunidad en un plásmido de *E. faecium* 6TI1 de 23 kb (Floriano *et al.*, 1998), y la enterocina Q en un plásmido de *E. faecium* L50 de 7,2 kb (pCIZ2) (Cintas *et al.*, 2000b).

#### III.4.3.1. Análisis del operón de la enterocina P de *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16

Con el objetivo de confirmar la presencia del gen estructural de la enterocina P (*entP*) en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, se secuenció un amplicón de 132 pb obtenido a partir del DNA total de dichas cepas empleando cebadores específicos de *entP*. La secuencia aminoacídica deducida de dicha secuencia nucleotídica fue idéntica a la de la enterocina P de *E. faecium* P13 (Casaus, 1998) y, por tanto, demostró la presencia en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 de la región de *entP* que codifica el péptido maduro.

Posteriormente, el solapamiento de las secuencias de varios productos de PCR hemiespecífico obtenidos con las mezclas de ligación de *E. faecium* G16 permitió obtener una secuencia de 707 pb contiguos (Fig. 3.8, sección III.3.10.1), de los que 205 no habían sido secuenciados con anterioridad. El análisis de esta nueva secuencia reveló la existencia de un posible ORF (*orf4*), con la misma polaridad que *entP*, que codifica un péptido de 26 aminoácidos (ORF4) sin homología significativa con otras proteínas de las bases de datos consultadas. Este hecho, junto al pequeño

tamaño y la ausencia de señales transcripcionales definidas, sugieren que se trata de un ORF no funcional.

La síntesis y secreción de bacteriocinas de la clase II requiere el producto de una serie de genes organizados en 1-3 operones, que pueden transcribirse en sentidos divergentes y que están involucrados en la expresión, inmunidad, translocación y regulación de la producción de la bacteriocina (Ennahar *et al.*, 2000). Dado que la enterocina P posee un péptido señal en su región N-terminal que le hace ser un candidato para el procesamiento y secreción por el sistema *sec* o ruta general de secreción (véase sección VI.4.1), resulta poco probable que detrás de *entiP* se localicen los genes de transporte presentes en los operones de las bacteriocinas de la clase II que se secretan mediante transportadores del tipo ABC; asimismo, tampoco se detectaron los genes involucrados en la regulación de la producción de la bacteriocina y, de hecho, la existencia en esta cepa de dichos mecanismos no se ha establecido por el momento.

#### III.4.3.2. Análisis de los operones de las enterocinas A y B de *E. faecium* P21

La visualización de los genes estructurales de las enterocinas A y B de *E. faecium* P21 se realizó secuenciando amplicones de 172 y 123 pb, respectivamente, obtenidos con cebadores específicos de los genes estructurales de dichas enterocinas. Las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas confirmaron que: (i) *E. faecium* P21 contiene el fragmento del gen estructural de la enterocina A (*entA*) que codifica la secuencia líder de 18 aminoácidos y los aminoácidos 1 a 39 del propéptido y (ii) *E. faecium* P21 contiene una parte del gen estructural de la enterocina B (*entB*), concretamente el fragmento que codifica los aminoácidos 12 a 53 del péptido maduro.

Asimismo, se obtuvo información adicional del operón de la enterocina A en *E. faecium* P21 mediante la secuenciación de un producto de PCR hemiespecífico con los cebadores TH10 y SK2. Dicho amplicón proporcionó una secuencia de 784 pb (Fig.3.9, sección III.3.10.3), de las que 484 correspondieron a *entA*, *entiA* y la región intergénica entre ambos de *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996). Las secuencias fueron idénticas, con la única excepción de que la asparagina en posición número 79 de la proteína de inmunidad de *E. faecium* CTC492 está codificada por el triplete AAC (Aymerich *et al.*, 1996), mientras que en *E. faecium* P21 dicho aminoácido se encuentra codificado por el triplete AAT. Esta diferencia en la secuencia nucleotídica que, no obstante, no altera la secuencia aminoacídica de la proteína de inmunidad, se detectó asimismo en *E. faecium* DPC1146 (O'Keefe *et al.*, 1999). El análisis del resto de la

secuencia adyacente a *entiA* de *E. faecium* P21 (300 pb) permitió identificar a una distancia de 104 pb del final de la proteína de inmunidad un marco de lectura abierto, *orf3*, que codifica una proteína de 48 aminoácidos (ORF3) idéntica al factor de inducción EntF de *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998) y *E. faecium* DPC1146 (O’Keeffe *et al.*, 1999). EntF presentó una identidad del 41% con el inductor de la carnobacteriocina B2 (CbnS) (Quadri *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1997) y del 34% con el hipotético factor de inducción de la sakacina A (ORF4) (Axelsson y Holck, 1995). En la Fig. 3.11 se muestra el alineamiento de los factores de inducción EntF, CbnS y ORF4, y la hipotética secuencia consenso de los tres péptidos. Como puede observarse, la región C-terminal de los péptidos aparece particularmente conservada y muestra la secuencia consenso CVFS-FKKC.

EntF	1	AGTKPQ-GKPA <sup>■</sup> SNLVE <sup>■</sup> CVFSLF <sup>■</sup> KKCN
CbnS	1	-SKNSQ <sup>■</sup> IGKSTSS <sup>■</sup> ISKCVFSFF <sup>■</sup> KKC-
ORF4	1	--TNRNYGKPNKDI <sup>■</sup> GTCI <sup>■</sup> WSGFRHC-
Consenso		--tn-q-GKp-s-i--Cv <sup>■</sup> fS-F <sup>■</sup> kkC-

**Fig. 3.11. Comparación de la secuencia aminoacídica de los factores de inducción de la enterocina A (EntF), carnobacteriocina B2 (CbnS) y sakacina A (ORF4).** El alineamiento de los factores de inducción se realizó con los programas *ClustalW* version 1.8, *Dialign2* y *MultAlin* version 5.4.1 del servidor ExPASy WWW del Swiss Institute of Bioinformatics (sección III.2.11). Los residuos presentes en los tres péptidos aparecen en cajas de color negro y los presentes en dos de los péptidos en cajas de color gris oscuro. Las sustituciones aminoacídicas de tipo conservativo se indican con cajas de color gris claro. En la parte inferior del alineamiento se muestra la secuencia aminoacídica consenso, en la que se indican con letras mayúsculas los residuos conservados en los tres péptidos, con letras minúsculas los conservados en dos de los péptidos y con un guión los residuos variables. Las abreviaturas de los aminoácidos aparecen en el Apéndice 2.

La existencia de mecanismos de regulación de la producción de bacteriocinas se ha descrito en muchas bacterias lácticas bacteriocinogénicas (Schnell *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1993; van der Meer *et al.*, 1993; Kuipers *et al.*, 1995; Saucier *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 1996; Eijsink *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Quadri *et al.*, 1997; Saucier *et al.*, 1997; Nilsen *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 1998; O'Keeffe *et al.*, 1999). La regulación se lleva a cabo mediante un sistema de tres componentes en el que intervienen, además del factor de inducción (IF), proteínas sensoras del tipo histidín-kinasa (HK) y proteínas reguladoras de respuesta (RR) (Nes *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997; Nes y Eijsink 1999). Dicho sistema presenta homología con los mecanismos que controlan el desarrollo de la competencia genética en *B. subtilis* (Magnuson *et al.*, 1994) y *S. pneumoniae* (Håvarstein *et al.*, 1995b) y la expresión de los factores de virulencia de *St. aureus* (Morfeldt *et al.*, 1996).

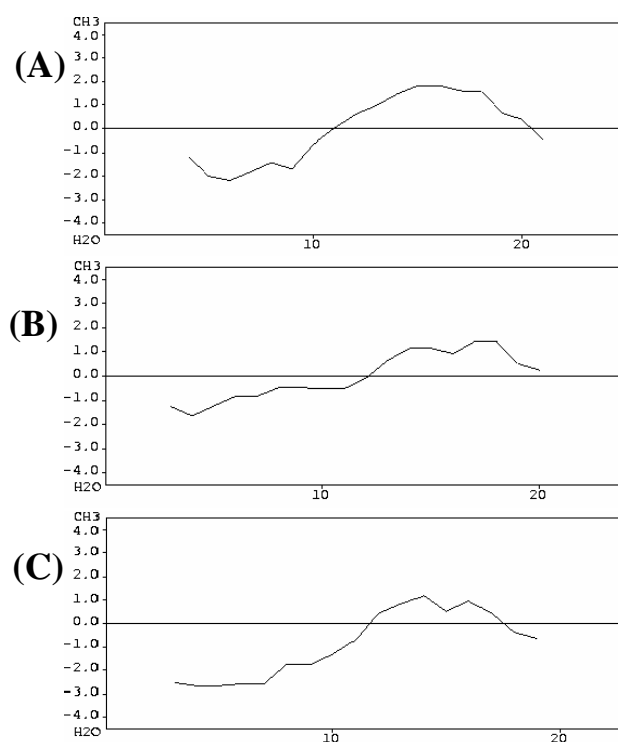
En la Tabla III.10 se muestran los principales parámetros físico-químicos de EntF, CbnS y ORF4, y en la Fig.3.12, el perfil de hidrofobicidad de estos péptidos. Los IFs de las bacteriocinas de la clase II presentan una serie de características similares a éstas, como son su naturaleza catiónica y ligeramente anfifílica (con un aumento de la hidrofobicidad hacia el extremo N-terminal), su elevado punto isoeléctrico y su capacidad para adoptar una estructura helicoidal en presencia de solventes orgánicos y liposomas (Eijsink *et al.*, 1996; Nes y Eijsink, 1999). Estas marcadas semejanzas sugieren que ambos péptidos tienen un ancestro común, constituido por una bacteriocina o un péptido regulador (Eijsink *et al.*, 1996).

En cuanto a las diferencias entre los IFs y las bacteriocinas, destaca, en primer lugar, la longitud de los péptidos: mientras que las bacteriocinas más pequeñas constan de aproximadamente 30 aminoácidos, el IF de mayor tamaño molecular descrito hasta la fecha, el IP-C11 de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1995), consta de 26 aminoácidos (Nes y Eijsink, 1999). Otra diferencia entre ambos tipos de péptidos consiste en la ausencia de actividad antimicrobiana de los factores de inducción. No obstante, se ha descrito que el IP-C11 posee cierta actividad antimicrobiana, aunque posiblemente de una relevancia biológica limitada (Anderssen *et al.*, 1998) y que la producción de carnobacteriocinas BM1 y B2 por *Cb. piscicola* LV17 podría estar inducida tanto por el factor de inducción CbnS como por la propia carnobacteriocina B2 (Quadri *et al.*, 1997). En este contexto, los lantibióticos nisina y subtilina poseen, además de actividad antimicrobiana, actividad inductora de la transcripción de sus respectivos operones (Kuipers *et al.*, 1995; Siezen *et al.*, 1996).

**Tabla III.10. Parámetros físico-químicos de los factores de inducción de la enterocina A (EntF), carnobacteriocina B2 (CbnS) y sakacina A (ORF4)**

	Pm (Da)	Nº aa	Carga neta <sup>a</sup>	pI teórico	Índice GRAVY
<b>EntF</b>	2.667	25	3	9,31	-0,228
<b>CbnS</b>	2.642	24	5	9,90	-0,275
<b>ORF4</b>	2.668	23	3	9,38	-1,061

Las características físico-químicas de los péptidos se determinaron con el programa ProtParam Tool del servidor ExPASy WWW del Swiss Institute of Bioinformatics (sección III.2.11). <sup>a</sup>Carga neta a pH 7,0. Símbolos y abreviaturas: Nº aa, número de aminoácidos; pI, punto isoelectrico; Índice GRAVY, valor promedio de hidrofobicidad.



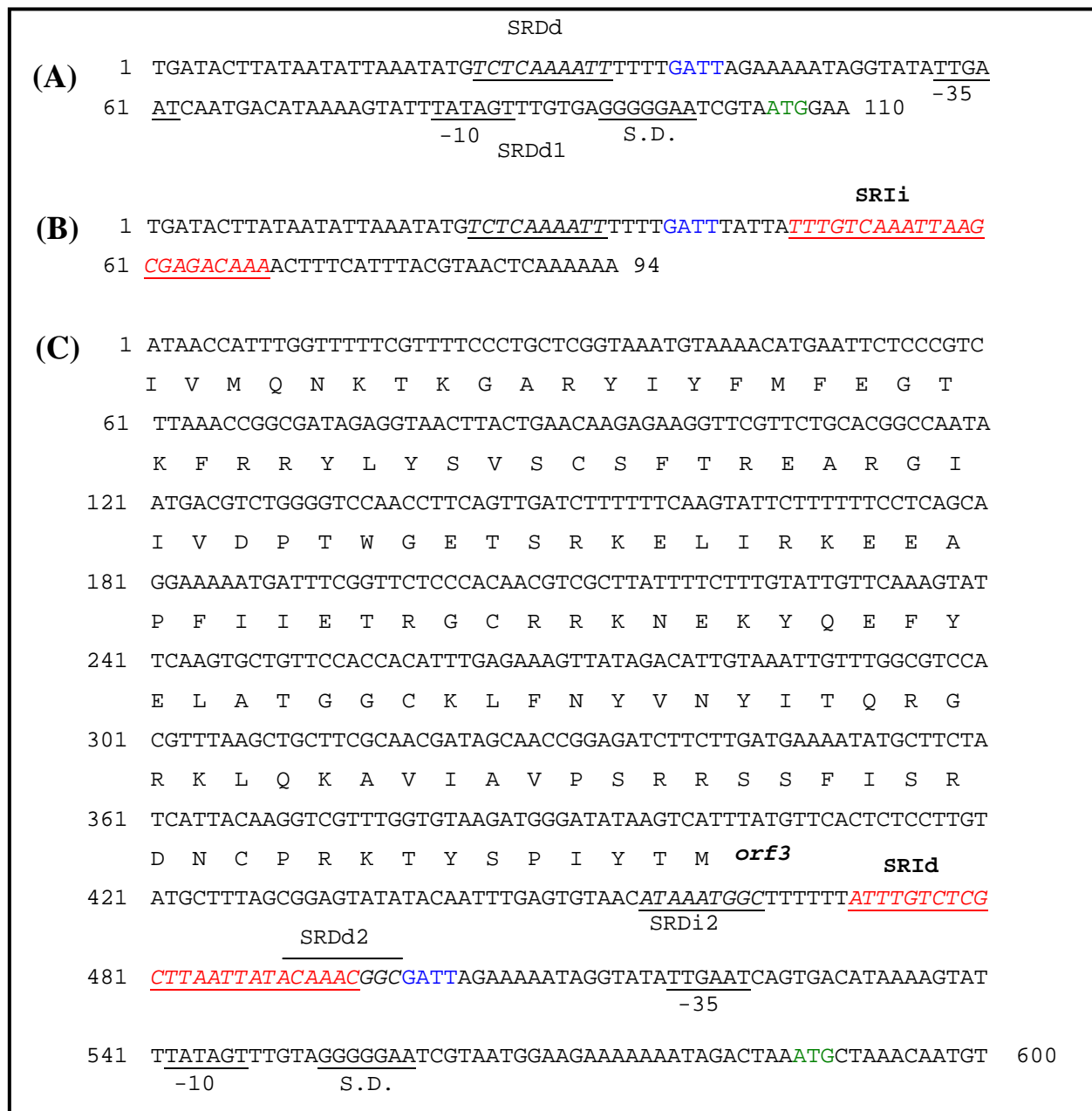
**Fig. 3.12. Perfil de hidrofobicidad de los factores de inducción EntF (A), CbnS (B) y ORF4 (C).** El perfil de hidrofobicidad se determinó con el programa GREASE (Kyte y Doolittle, 1982) del servidor Biology Workbench version 3.2 (sección III.2.11) para una ventana de 7 aminoácidos. El eje de abscisas representa el número de residuo aminoacídico de los péptidos. La línea horizontal de ordenada 0 es la línea divisoria de las regiones hidrófoba (superior) e hidrófila (inferior).



Los IFs actúan a concentraciones nanomolares, a excepción de EntF, activo a concentraciones femtomolares. Esta mayor actividad específica de EntF podría ser reflejo de la menor producción del factor de inducción de *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998) en comparación con otros operones regulados, en los que la producción del IF y de la bacteriocina es comparable.

Los genes que forman parte de los sistemas de regulación de las bacteriocinas de la clase II están organizados en un operón compuesto por los genes del IF y de las proteínas HPK y RR (sección II.2.4.4). Dado que los IF se producen como prepropéptidos con una secuencia líder del tipo doble glicina en su extensión N-terminal, no es extraño que en algunos casos se haya observado que los genes de IF, HPK y RR se cotranscriben con los de las proteínas transportadoras del tipo ABC y accesorias encargadas del procesamiento y transporte de las bacteriocinas al medio exocelular (Axelsson y Holck, 1995; Franke, 1998; Hühne *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Quadri *et al.*, 1997). Estas proteínas serían, por tanto, esenciales para la activación y la externalización del IF (Nes y Eijsink, 1999). El efecto del IF consiste en la inducción de la expresión de todos los genes necesarios para la biosíntesis de las bacteriocinas, incluyendo el propio IF (autoinducción) (Nes y Eijsink, 1999).

En la Fig. 3.13 se muestra la secuencia nucleotídica del operón de la enterocina A de *E. faecium* P21 y *E. faecium* CTC492, y en la Fig.3.14, la organización genética de dicho operón en *E. faecium* P21, *E. faecium* DPC1146 y *E. faecium* CTC492. La localización de los genes que codifican el factor de inducción (*entF*) es similar en *E. faecium* P21 y *E. faecium* DPC1146, ya que éstos se encuentran a una distancia de 104 y 93 pb, respectivamente, por detrás de *entiA*; sin embargo, Nilsen *et al.* (1998) determinaron que, en *E. faecium* CTC492, *entA* y *entF* están separados aproximadamente por 1,6 kb, lo que implica la existencia de una amplia región intergénica entre el final de *entiA* y el comienzo de *entF* en dicha cepa. El análisis comparativo de la secuencia de dicha región intergénica en *E. faecium* P21 y *E. faecium* CTC492 reveló que tan sólo las primeras 41 pb de *E. faecium* P21 eran idénticas a las de la secuencia de 94 pb adyacente a *entiA* de *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996), observándose en ambas cepas la presencia de secuencias repetidas directas (SRD) de 10 pb, denominadas SRDi (secuencia repetida directa izquierda) y SRDd (secuencia repetida directa derecha). La SRDi y SRDd, situadas al final de *entiA* y en la región intergénica, respectivamente, se encuentran separadas por 25 pb y poseen las secuencias TCTCAATTTT y TCTCAAATT, respectivamente (Figs. 3.13 y 3.14). La presencia de SRD de alrededor de 10 pb con una separación aproximada de 2 vueltas de hélice del DNA (“cajas



**Fig. 3.13. Análisis de la secuencia nucleotídica de las regiones intergénicas *entiA-entF* de *E. faecium* P21 (A) y *E. faecium* CTC492 (B y C).** La secuencia de 110 pb de *E. faecium* P21 (A) comienza en el nucleótido situado a continuación del codón de terminación de la traducción (TAA) de *entiA*. La secuencia de 94 pb (B) se obtuvo de Aymerich *et al.* (1996) y comienza en el mismo punto que la anterior. La secuencia de 600 pb (C) se obtuvo de Nilsen *et al.* (1998) y comienza en un punto no determinado de la región intergénica *entiA-entF* de *E. faecium* CTC492. En color azul, se muestra la secuencia tetramérica GATT que flanquea la IS de *E. faecium* CTC492. En color rojo y subrayadas se encuentran las secuencias repetidas inversas (SRIi y SRId) de la IS de *E. faecium* CTC492. La secuencia aminoacídica codificada por *orf3* se muestra bajo la correspondiente secuencia nucleotídica. El codon de iniciación de la traducción (ATG) del factor de inducción EntF aparece en color verde, y las regiones -35 y -10 de su hipotético promotor y la región Shine-Dalgarno (S.D.) aparecen subrayadas. El código genético y las abreviaturas de los aminoácidos se muestran en el Apéndice 2.

**Fig. 3.14. Representación esquemática de los genes del operón de la enterocina A identificados en *E. faecium* P21 (A), *E. faecium* DPC1146 (A) y *E. faecium* CTC492 (B).** La región secuenciada se representa como una línea en la que *entA*, *entIA* y *entF* aparecen como flechas orientadas en dirección 3', y *orf3* como una flecha truncada en dirección 5'. Las regiones -10 y -35 de los hipotéticos promotores de *entA*, *entF* y *orf3* aparecen como triángulos de color naranja. Las secuencias repetidas directas (SRD) e inversas (SRI) aparecen como rectángulos verticales rayados de color gris o fucsia, respectivamente, y se indican con "d" (derecha) o "i" (izquierda). Las secuencias Shine-Dalgarno están representadas por óvalos negros. \*La distancia intergénica *entIA-entF* es de 104 pb en *E. faecium* P21 y de 93 pb en *E. faecium* DPC1146 (O'Keefe *et al.*, 1999). En la parte superior se muestra una línea con la escala en pb.

reguladoras”) es una característica de los promotores regulados (Diep *et al.*, 1996; Eijnsink *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996) y, recientemente, se ha demostrado que representan los sitios de unión de los dímeros de las proteínas reguladoras de respuesta activadas (Risøen *et al.*, 1998). Nilsen *et al.* (1998) indicaron que las diferencias existentes entre los promotores de *entA* y *entF* podrían permitir la expresión diferencial de dichos genes cuando ambos son inducidos por el mismo IF.

La secuencia tetramérica GATT situada entre los nucleótidos 38 y 41 por detrás de *entiA* señala el punto a partir del cual las secuencias de *E. faecium* P21 y *E. faecium* CTC492 divergen. De manera análoga, O’Keeffe *et al.* (1999) obtuvieron una secuencia de 10.879 pb a partir del cromosoma de *E. faecium* DPC1146 que divergía de la de *E. faecium* CTC492 en un punto situado 41 pb por detrás del codon de terminación de la traducción de *entiA*. Cuando estos autores analizaron el punto de inserción del transposón Tn916 en mutantes de *E. faecium* DPC1146 deficientes en la producción de enterocina A, observaron que coincidía con el punto en el que la secuencia de *E. faecium* CTC492 divergía de la de *E. faecium* DPC1146, concretamente, detrás de los nucleótidos GATT.

Dado que en *E. faecium* CTC492 existe una copia de GATT a la altura del nucleótido 499 de la secuencia publicada por Nilsen *et al.* (1998), la amplia región intergénica *entiA-entF* de esta cepa está flanqueada por el tetrámero GATT. El análisis de la secuencia de 498 pb situados por delante de la segunda secuencia tetramérica GATT en *E. faecium* CTC 492 mostró la existencia de un ORF incompleto (provisionalmente designado *orf3*) de polaridad opuesta a *entF* que codifica una proteína de 134 aminoácidos (Fig.3.13). La comparación de esta secuencia con la de otras proteínas de las bases de datos mostró una identidad del 56% con la transposasa de la secuencia de inserción IS1252 del plásmido pHKK701 de *E. faecalis* R7 (Heaton *et al.*, 1996), del 50% con la transposasa de la IS enterococal IS6770 (Thorisdottir *et al.*, 1994), y del 44% con la transposasa de la IS1062 del plásmido pPD1 de *E. faecalis* (Hirt *et al.*, 1996) y con una transposasa de *Lb. fermentum* localizada en un plásmido que le confiere resistencia a eritromicina (Fons *et al.*, 1997).

Estos resultados sugieren que en el operón de la enterocina A de *E. faecium* CTC492 se ha introducido una secuencia de inserción (IS, del inglés *Insertion Sequence*) entre *entiA* y *entF*. Dicha IS contiene el gen que codifica la transposasa (*orf3*) flanqueado por dos secuencias repetidas inversas (SRI) de 23 pb, denominadas SRIi (izquierda) (TTTGTCAAATTAAGCGAGACAAA) y SRId (derecha) (AAACATATTAATTCGCTCTGTTT). La SRId aparece parcialmente solapada con la SRDd2 que forma parte del segundo juego de SRD detectadas en *E. faecium* CTC492. (Figs. 3.13, 3.14). De manera análoga, se observó la existencia de una IS entre el gen que codifica la proteína de inmunidad de la sakacina A y su hipotético factor de inducción (ORF4) en *Lb. sakei* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995).

La integración de la IS en el cromosoma de *E. faecium* CTC492 originó la duplicación de la secuencia tetramérica GATT que aparece en sus extremos. La generación de repeticiones directas cortas (2-13 pb) es una característica de las IS y se debe presumiblemente al corte “escalonado” del DNA diana durante la inserción. Dado que no se dispone de la secuencia nucleotídica completa de la IS de *E. faecium* CTC492, tan sólo fue posible determinar la secuencia aminoacídica parcial de la transposasa. A pesar de ello, de acuerdo con la organización general observada en las ISs o transposones simples, es posible hipotetizar que delante de *orf3*, y con la misma polaridad que éste, se encuentre el gen que codifica la integrasa de la IS.

La IS6770, que presenta una homología del 50% con la de *E. faecium* CTC492, está ampliamente distribuida dentro del género *Enterococcus* (Thorisdottir *et al.*, 1994). Dicha IS se inserta preferentemente en el cromosoma y parece no necesitar para ello secuencias específicas (*hot spots*). No obstante, la especificidad de inserción puede resultar no sólo del reconocimiento de secuencias específicas, sino también de rasgos estructurales o funcionales del DNA o de una combinación de estos factores (Galas y Chandler, 1989). De hecho, IS1, una secuencia de inserción de *E. coli*, que constituye la IS de menor tamaño conocido (784 bp), presenta cierta preferencia por regiones ricas en A+T (Galas y Chandler, 1989), lo que también se ha observado en IS1515 de *Streptococcus pneumoniae* (Muñoz *et al.*, 1998). En este contexto, la IS de *E. faecium* CTC492 se encuentra flanqueada en su extremo izquierdo por la secuencia AAAATTTTTTGATT, y en su extremo derecho por GATTAGAAAAATA, es decir, por secuencias ricas en A+T.

Entre los efectos atribuibles a las ISs, en algunos casos se ha descrito una activación de la transcripción de los genes contiguos a ésta, bien porque la propia IS contenga regiones promotoras de la transcripción, o bien, porque se forme un promotor híbrido como consecuencia de la inserción (Galas y Chandler, 1989; Skaugen y Nes, 1994). Aunque éste no parece ser el caso de *entF*, cuyas regiones -35 y -10 del hipotético promotor son externas a la IS, es interesante destacar que las secuencias repetidas directas de 9 nucleótidos, SRDi2 (ATAAATGGC) y SRDd2 (ACAAACGCC), se encuentran en el interior de dicha secuencia. A este respecto, la presencia de la transposasa podría explicar las diferencias observadas en la producción de bacteriocinas en ambas cepas.

Los elementos transponibles o transposones fueron descritos por primera vez por Barbara McClintock en el genoma del maíz en los años cincuenta. Aún en la actualidad no se conoce con precisión la función que desempeñan y permanece sin resolver la cuestión de si, desde el punto de vista de la selección, tienen un papel neutro o negativo ([...] *Aunque los transposones pueden influir en la evolución, su papel principal es copiarse a sí mismos, frecuentemente a expensas de los genes que inactivan. Son, por tanto, genuinamente egoístas*”, Cookson, 1996) o bien, si confieren alguna

ventaja selectiva o adaptativa al hospedador. A este respecto, aunque los genes que proporcionan resistencia a antibióticos, frecuentemente encontrados en los transposones compuestos, confieren una ventaja selectiva considerable a las cepas que los poseen en presencia del antibiótico, es difícil establecer si dichas condiciones selectivas ocurren en poblaciones naturales (Galas y Chandler, 1989).

La secuencia localizada detrás de GATT es idéntica en *E. faecium* P21 y *E. faecium* CTC492 y contiene el gen que codifica EntF. A pesar de que no se dispone de la secuencia nucleotídica situada detrás de dicho gen en *E. faecium* P21 ni en *E. faecium* CTC492, es posible especular, de acuerdo con la organización genética general de los operones de las bacteriocinas cuya producción está regulada, que detrás de *entF* se encuentran los genes de las proteínas HPK y RR, como se ha demostrado recientemente en *E. faecium* DPC1146 (O'Keefe *et al.*, 1999). A pesar de que no se han realizado experimentos concluyentes en este sentido, los resultados de este trabajo sugieren que, a diferencia de lo que sucede en *E. faecium* CTC492 y *E. faecium* DPC1146, la producción de enterocina A en *E. faecium* P21 no se encuentra bajo el efecto de mecanismos reguladores. No obstante, no es posible descartar que en dicha cepa la producción esté bajo el control de mecanismos de autoinducción totalmente funcionales y, por tanto, no detectables bajo las condiciones de laboratorio (Eijsink *et al.*, 1996). Callewaert *et al.* (1999) señalaron la posibilidad de que el factor de inducción sea capaz de adherirse fuertemente a las células, lo que produciría un estado de producción continuamente activado y explicaría la producción aparentemente constitutiva en cepas en las que se han detectado sistemas reguladores de tres componentes (Axelsson y Holck, 1995).

Como se señaló en la introducción (sección II.2.4.4.1.), se han propuesto dos mecanismos de actuación para los sistemas de regulación de tres componentes basados en: (i) la monitorización de la densidad celular mediante el IF producido de forma constitutiva y (ii) la acción de determinados factores ambientales no identificados que actuarían activando la transcripción del IF (Nes y Eijsink, 1999). Nilsen *et al.* (1998) proponen un mecanismo mixto, por el que la acción de determinados factores ambientales, como el pH, la concentración de NaCl o etanol, podría disminuir la eficacia de la interacción entre el IF y los componentes encargados de la monitorización de la densidad celular (proteínas HK y RR). Otros investigadores han observado la estimulación de la producción por factores externos tales como mitomicina C (Rammelsberg *et al.*, 1990; Frémaux *et al.*, 1993) o por proteínas heterólogas (Barefoot *et al.*, 1994). El significado de la existencia de mecanismos de regulación en la producción de algunas bacteriocinas no es evidente, pero podría interpretarse que la capacidad de expresar dicho fenotipo en función del estado de ciertos factores del medio y de una

manera sincronizada en todos los individuos de una población podría estar favorecida por la selección natural (Nes y Eijsink, 1999; Skaugen *et al.*, 2000).

En lo que se refiere al análisis del operón de la enterocina B en *E. faecium* P21, los esfuerzos de secuenciación se concentraron en la región localizada delante del gen estructural de la enterocina B (*entB*), ya que Casaus (1998) observó la presencia de un terminador simple (*rho*-independiente) de la transcripción situado 4 pb por detrás del codon de terminación de la preenterocina B de *E. faecium* T136. Dicha región nucleotídica está constituida por dos secuencias repetidas inversas ricas en A+T (GAAGAGAAAAAACTC y GAGTTTTTTCTCTTC) separadas por 5 pb y seguidas de una cola de timinas (TTTTTT). El mRNA transcrito a partir de esta secuencia adoptaría una estructura secundaria en forma de horquilla que podría actuar como un terminador simple o *rho*-independiente de la transcripción (León y García, 1992). No obstante, desafortunadamente no se obtuvieron productos de PCR que proporcionaran información acerca de la secuencia localizada delante de *entB* en *E. faecium* P21.

Recientemente, Franz *et al.* (1999) han determinado la organización de los determinantes genéticos para la producción de la enterocina B en *E. faecium* BFE 900. Los autores secuenciaron un fragmento de DNA cromosómico de aproximadamente 2,2 kb que contenía ocho ORFs, dos de ellos orientados en la dirección 5'a 3'(*orf1* y *entB*) y seis en la dirección opuesta (*orf2* a *orf6*, y *eniB*). El ORF *eniB*, localizado en posición adyacente a *entB*, aunque en orientación opuesta, constituye el gen que codifica la proteína de inmunidad de la enterocina B. Por otra parte, el producto de *orf6*, localizado detrás de *eniB* y en la misma orientación que éste, es un péptido pequeño (21 aminoácidos) y con un líder del tipo glicina, que podría actuar como IF. No obstante, a pesar de la presencia del hipotético gen del IF y de secuencias conservadas similares a las cajas reguladoras descritas por Diep *et al.*, (1996) localizadas delante del mismo, la producción de enterocina B en *E. faecium* BFE 900 es constitutiva (Franz *et al.*, 1999), lo que difiere de la producción regulada descrita en *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998). Una posible explicación a esta observación es que la producción de enterocina B en *E. faecium* BFE 900 estuviera regulada anteriormente y que, durante el curso de la evolución, la producción se haya transformado en constitutiva (Franz *et al.*, 1999).

En definitiva, la organización genética de los operones para la producción de enterocina B es atípica, puesto que, en la mayoría de las bacteriocinas de la clase II, el gen de la inmunidad se localiza inmediatamente detrás del gen estructural y en el mismo operón que éste (Aymerich *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000; Skaugen *et al.*, 2000). Esta organización está muy

conservada en las bacteriocinas de la clase II, siendo las únicas excepciones conocidas la divercina V41 (Métivier *et al.*, 1998) y la carnobacteriocina A (Worobo *et al.*, 1994).

#### **III.4.3.3. Búsqueda de genes que codifiquen bacteriocinas del tipo pediocina distintas de las enterocinas P y A**

Las experiencias bioquímicas y genéticas realizadas en este trabajo demuestran inequívocamente que *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16 producen la enterocina P, y que *E. faecium* P21 produce las enterocinas A y B, y, además, confirman la gran utilidad de las pruebas de actividad antimicrobiana cruzada e inmunidad y de la técnica de PCR en la determinación de la presencia de bacteriocinas previamente descritas en las cepas en estudio.

No obstante, como se discutió en la sección III.4.4, existía la posibilidad de que estas cepas produjeran bacteriocinas adicionales a las descritas. Con el objetivo de detectar las hipotéticas bacteriocinas de la clase IIa diferentes de la enterocina P en *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, y de la enterocina A en *E. faecium* P21 se empleó la técnica de PCR hemiespecífico con el cebador degenerado CH1, que contiene la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica YGNGVY. No obstante, no fue posible obtener una secuencia nucleotídica a partir de estos productos. La explicación de este hecho podría ser que la concentración de DNA en el producto de PCR purificado fue muy baja, posiblemente como consecuencia de que el cebador degenerado hibridara con múltiples zonas del DNA y originara varios productos en lugar de proporcionar uno mayoritario. Asimismo, es posible que se tratase de falsos positivos no reconocidos por el cebador durante la reacción de secuenciación.

A pesar de que las bacteriocinas identificadas en este trabajo resultaron idénticas a otras previamente descritas, este hallazgo no carece de interés científico. En este sentido, la presencia de genes estructurales idénticos en cepas de diversa procedencia podría indicar un origen filogenético común de éstas, que habrían conservado los genes para la producción de bacteriocinas a lo largo de su diferenciación. El hecho de que estos genes estén muy conservados sugiere que podrían conferir una ventaja evolutiva a las cepas productoras (Aymerich *et al.*, 2000a). En este contexto, la producción de bacteriocinas idénticas por cepas distintas es un hecho frecuente. Así por ejemplo, la producción de lactocina S se ha descrito en *Lb. sakei* 148 (Sobrinho *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1995a; Cintas *et al.*, 1998a), *Lb. sakei* L45 (Mørtvedt *et al.*, 1991) y *Lb. sakei* V18 (Cintas, 1995); la nisina A se ha detectado en diversas cepas de *L. lactis* obtenidas de productos lácteos (Hurst *et al.*, 1981), cárnicos (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995b) y vegetales (Harris *et*



*al.*, 1992); la enterocina I, producida por *E. faecium* 6T1a (Floriano *et al.*, 1998) es idéntica a la enterocina L50A producida por *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998b); la sakacina K producida por *Lb. sakei* CTC494 (Aymerich *et al.*, 2000a) es idéntica a la sakacina A de *Lb. sakei* Lb706 (Holck *et al.*, 1992); la plantaricina D de *Lb. plantarum* CTC305 (Aymerich *et al.*, 2000a) es idéntica a la plantaricina A producida por *Lb. plantarum* C11 (Nissen-Meyer *et al.*, 1992b). En cuanto a las enterocinas identificadas en este trabajo, la enterocina A se detectó originalmente en *E. faecium* CTC492 (Aymerich, 1996) y, posteriormente, en *E. faecium* T136 (Casaus *et al.*, 1997; Casaus, 1998) y *E. faecium* DPC1146 (O'Keeffe *et al.*, 1999), donde fue descrita inicialmente como enterocina 1146 (Parente y Hill, 1992a). Casaus (1998) describió una bacteriocina diferente de la enterocina A en *E. faecium* T136, a la que denominó enterocina B, cuya presencia se detectó posteriormente en *E. faecium* CTC492; asimismo, Franz *et al.* (1999) identificaron el gen estructural de la enterocina B en *E. faecium* BFE900.

También se ha descrito la producción de bacteriocinas idénticas por microorganismos de especies distintas, como la sakacina A (Axelsson *et al.*, 1993) y la curvacina A (Tichaczek *et al.*, 1993), producidas por *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*, respectivamente, y la sakacina P (Tichaczek *et al.*, 1992) y la bavaricina A (Larsen *et al.*, 1993) producidas por *Lb. sakei* y *Lb. bavaricus*, respectivamente. Finalmente, la producción de pediocina PA-1 se ha detectado en diversas cepas de *P. acidilactici* de origen cárnico (Moreira, 1993; Cintas, 1995; Rodríguez *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1998a), en *P. parvulus* aislado de productos vegetales (Bennik *et al.*, 1997a) y en *Lb. plantarum* WHE92 aislado de queso (Ennahar *et al.*, 1996).



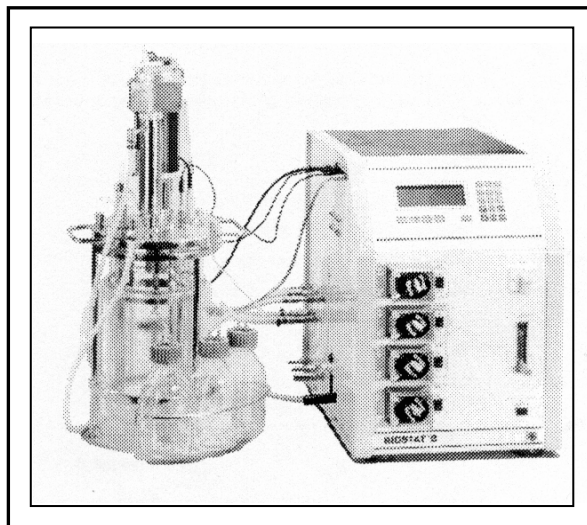
## *CAPÍTULO IV*

*DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES  
ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P POR  
*E. faecium* P13*



## IV.1. INTRODUCCIÓN

El empleo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas como bioconservantes alimentarios representa una alternativa atractiva al uso de los conservantes tradicionales. Sin embargo, la aplicación comercial efectiva de las bacteriocinas en la industria alimentaria requiere el desarrollo de un proceso de producción a gran escala que proporcione rendimientos económicamente rentables y, eventualmente, un suministro regular para el mercado (Bárcena *et al.*, 1998). Además, la optimización del proceso



productivo de estos péptidos facilitaría la realización de estudios físico-químicos, tales como la determinación de su mecanismo de acción molecular (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; Bárcena *et al.*, 1998).

La optimización de la producción de las bacteriocinas se basa en la modificación de las condiciones ambientales de crecimiento del microorganismo productor. La elección del medio de cultivo, de la temperatura y tiempo de incubación, y, particularmente, del pH, influyen considerablemente en la producción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Yang y Ray, 1994; Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995). En este sentido, se ha observado que la producción de bacteriocinas aumenta cuando las fermentaciones se realizan en un fermentador bajo condiciones de pH controlado, lo que, debido al carácter de metabolito primario que tienen la mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, se ha correlacionado con la mayor densidad celular obtenida en dichas condiciones (Yang y Ray, 1994). No obstante, a pesar de que las condiciones medioambientales tienen una gran influencia en el crecimiento del microorganismo productor y en la producción de bacteriocinas, la relación existente entre ambos parámetros no se conoce con precisión (Parente *et al.*, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996; Krier *et al.*, 1998) y las condiciones óptimas de producción varían en función de la bacteriocina producida, e incluso, de la cepa productora.

El trabajo experimental descrito en el presente capítulo tuvo como objetivos la identificación del pH óptimo para el crecimiento de *E. faecium* P13 y su producción de enterocina P, la determinación de la cinética de producción e inactivación de la bacteriocina y la evaluación de hipótesis que podrían explicar las diferencias observadas en dichos parámetros en función de las

condiciones ambientales de crecimiento del microorganismo productor. Asimismo, se determinó el efecto del NaCl, del etanol y del medio BHI en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de enterocina P.

## IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.2.1. INFLUENCIA DEL pH INICIAL DEL CALDO MRS EN EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y EN LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P

Para determinar la influencia del pH inicial del caldo MRS (Oxoid) en el crecimiento y la producción/detección de la enterocina P de *E. faecium* P13 se prepararon tubos de 10 ml de dicho caldo y se ajustó su pH a 4,0; 4,3; 4,7; 5,3; 5,7; 6,0; 6,5; 7,0 y 8,0 con HCl o NaOH concentrados.

El inóculo del microorganismo productor se preparó cultivando un volumen correspondiente a un asa de siembra de *E. faecium* P13 en 10 ml de caldo MRS a 32°C durante 16 h. El inóculo procedía de un lote de cultivos en caldo MRS con 15% de glicerol conservados a -20°C; posteriormente, *E. faecium* P13 se subcultivó (0,1%, v/v) en el mismo medio y bajo idénticas condiciones de incubación. A continuación, se inocularon ( $5 \times 10^3$  ufc/ml) por duplicado los tubos de caldo MRS con el pH inicial ajustado a los distintos valores, así como dos tubos de MRS cuyo pH no se había ajustado (denominados “tubos control”, pH inicial  $\approx 6,2$ ) y se incubaron a 32°C.

A intervalos variables, se tomaron muestras de 300  $\mu$ l de cada uno de los cultivos y se determinó su densidad óptica a 620 nm ( $DO_{620}$ ) en un espectrofotómetro; asimismo, se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes (sección III.2.2.1) para determinar su actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.4.4) empleando como microorganismo indicador *E. faecium* T136. En todos los ensayos de actividad antimicrobiana se empleó como control interno un sobrenadante de *E. faecium* P13 con una actividad conocida (450 UB/ml)

### IV.2.2. INFLUENCIA DEL NaCl Y DEL ETANOL EN EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y EN LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P

Para determinar la influencia del NaCl y del etanol en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción/detección de enterocina P se prepararon tubos de 10 ml de caldo MRS con NaCl al 0,5; 0,75; 1; 3; 5; 8 y 10% (p/v) o con etanol al 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6 y 7% (v/v). Para cada concentración de NaCl y etanol se sembraron dos tubos con un inóculo del 0,5%, preparado como se ha descrito en la sección anterior, y se incubaron a 32°C. Asimismo, se inocularon dos tubos de MRS sin NaCl ni etanol (“tubos control”). A intervalos variables, se tomaron muestras de 300  $\mu$ l y se procedió a determinar por duplicado su  $DO_{620}$  en un espectrofotómetro y la actividad antimicrobiana de sus

sobrenadantes mediante un ensayo en placas microtituladoras. Finalmente, se calculó la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de los cultivos. La  $\mu$  se define como el aumento de la concentración celular ( $x$ ) por unidad de tiempo ( $t$ ) y por célula, lo que, matemáticamente, se expresa mediante la siguiente ecuación diferencial:

$$\mu(t) = \frac{\frac{dx(t)}{dt}}{x(t)} \quad (1)$$

Mediante un cálculo simple, la ecuación (1) se transforma en:

$$\mu(t) = \frac{d(\ln x(t))}{dt} \quad (2)$$

La ecuación (2) permite calcular  $\mu$  como la pendiente de una curva de crecimiento en la que se representa el  $\ln x(t)$  en función del tiempo. Durante la fase exponencial de crecimiento,  $\mu$  es máxima y constante y se denomina  $\mu_{\text{máx}}$ .

#### IV.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* P13

La optimización de la producción de la enterocina P de *E. faecium* P13 se realizó en un tanque reactor de 3 l de capacidad integrado en un fermentador de mesa modelo Biostat B (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemania). El tanque reactor con 2 l de caldo MRS con el pH ajustado a 4,7; 5,0; 5,3; 5,7; 6,0; 6,2; 7,0 y 8,5 con HCl o NaOH concentrados, y sus accesorios (sonda de temperatura, sonda de pH, sonda de O<sub>2</sub> y botellas de adición de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH y glucosa) se esterilizaron en un autoclave a 121°C durante 40 min. Una vez atemperado el sistema, el tanque reactor se inoculó con aproximadamente  $5 \times 10^3$  ufc/ml de un cultivo de *E. faecium* P13 preparado según lo descrito en la sección IV.2.1. El pH inicial del medio de cultivo se mantuvo constante ( $\pm 0,05$ ) durante el proceso de fermentación mediante la adición automática de NaOH 12N con una bomba peristáltica.

Dado que *E. faecium* P13 posee un metabolismo homofermentativo, su consumo de glucosa se puede calcular a partir del consumo de NaOH considerando que la fermentación de 1 mol de glucosa (180 g) produce 2 moles de ácido láctico (90 g/mol), para cuya neutralización son



necesarios 2 moles de NaOH (40 g/mol), lo que representa un consumo de 36,5 ml de NaOH 12N. Para impedir que la falta de glucosa pudiera ser el factor limitante en el crecimiento y/o en la producción de enterocina P por *E. faecium* P13, se añadieron al cultivo 60 g adicionales de este monosacárido (150 ml de una solución de glucosa al 40% esterilizada con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro) antes de que se produjera el consumo total de la glucosa presente inicialmente en el medio (40 g).

Todas las fermentaciones se realizaron a una temperatura de  $32 \pm 0,1^\circ\text{C}$  y con agitación moderada (50 rpm) para asegurar la homogeneidad del caldo de cultivo. El cultivo se mantuvo en condiciones de anaerobiosis mediante la adición automatizada intermitente de gas  $\text{N}_2$  esterilizado por filtros de aire de 0,22 µm de diámetro de poro (Whatman, Arbor Technologies, Inc., Ann Arbor, EE.UU.). A intervalos variables, se registró el consumo de NaOH de los cultivos para calcular su consumo de glucosa y se tomaron muestras para determinar por duplicado su  $\text{DO}_{620}$  en un espectrofotómetro, así como la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.2.1). Finalmente, se representaron la  $\text{DO}_{620}$ , la actividad antimicrobiana y el consumo de glucosa de los cultivos en función del tiempo.

#### IV.2.3.1. Modelado del crecimiento de *E. faecium* P13

La  $\mu_{\text{máx}}$  de los cultivos se obtuvo ajustando los datos experimentales de crecimiento al modelo de Baranyi y Roberts (1994), que expresa el crecimiento celular de un cultivo en el tiempo con la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dx}{x dt} = \alpha(t) \mu_{\text{máx}} u(x) \quad (0 \leq t < \infty; 0 < x) \quad (3)$$

donde  $x(t)$  representa la concentración celular de una población bacteriana en el tiempo  $t$ ,  $\mu_{\text{máx}}$  es la tasa específica de crecimiento máxima,  $\alpha(t)$  es una función de “ajuste” que afecta al curso del crecimiento antes de la fase exponencial y describe la adaptación del cultivo al nuevo ambiente, y  $u(x)$  es una función de “inhibición” que proporciona la transición de la curva de crecimiento hacia la fase estacionaria.

#### IV.2.3.2. Modelado de la producción e inactivación de la enterocina P

Con el objeto de comparar y modelar los resultados de actividad antimicrobiana obtenidos a diferentes valores de pH, se puede emplear una regresión lineal en la que la producción e inactivación de la bacteriocina se expresan mediante las siguientes ecuaciones diferenciales (Lejeune *et al.*, 1998):

$$\frac{dB}{dt} = k_b \frac{dX}{dt}, \text{ si } X < X' \quad (4)$$

$$\frac{dB}{dt} = k' B, \text{ si } X > X' \quad (5)$$

donde  $B$  es la producción de bacteriocina (UB/ml),  $k_b$  es la tasa específica de producción de bacteriocina (UB/ml·g),  $k'$  es la tasa específica de degradación de la bacteriocina,  $X$  es la concentración celular (g/l) y  $X'$  es la concentración celular a la que cesa la producción de bacteriocina. Dado que en el presente trabajo la  $DO_{620}$  se utilizó como una medida indirecta de la concentración celular, se calcularon unos coeficientes  $k_b$  y  $k'$  modificados para comparar la producción e inactivación de la bacteriocina a los diferentes valores de pH ensayados.

#### IV.2.4. ADSORCIÓN DE LA ENTEROCINA P A LAS CÉLULAS DE *E. faecium* P13 Y EXTRACCIÓN DE LA ENTEROCINA P ADSORBIDA

##### IV.2.4.1. Adsorción de la enterocina P a las células productoras a distintos valores de pH

La determinación de la influencia del pH en la adsorción de la enterocina P a las células del microorganismo productor se realizó empleando una modificación del método descrito por Yang *et al.* (1992). Las células de un cultivo de *E. faecium* P13 obtenido en las condiciones descritas en la sección IV.2.1. se lavaron dos veces con tampón fosfato sódico (NaP) 5mM (pH 6,2) y se resuspendieron en 200 µl del mismo tampón NaP con el pH ajustado a 2,0; 4,0; 4,7; 5,0; 5,3; 5,7; 6,0; 6,2; 6,5; 7,0 u 8,5. Paralelamente, se liofilizaron 60 ml de un sobrenadante de *E. faecium* P13 y, posteriormente, se resuspendieron sus extractos en 3 ml de tampón NaP (pH 6,2), obteniéndose un sobrenadante concentrado 20 veces. A continuación, se añadieron 75 µl del sobrenadante concentrado a una suspensión de 75 µl de células en 1.350 µl de tampón NaP al mismo pH que las células. Asimismo, se prepararon controles de dos tipos. El control I consistió en las células

resuspendidas en 75 µl de MRS en lugar de sobrenadante y el control II se preparó con 75 µl de sobrenadante y 1.425 µl de tampón.

Las suspensiones de células y enterocina P en el tampón NaP con el pH ajustado a los distintos valores, así como los controles I y II, se incubaron a 4°C durante 1 hora. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm y 4°C durante 5 min y se obtuvieron los sobrenadantes de las distintas suspensiones celulares y de los controles, cuya actividad antimicrobiana se determinó mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.4.4).

#### **IV.2.4.2. Extracción de la enterocina P de las células productoras**

La extracción de la bacteriocina adsorbida a las células del microorganismo productor se realizó mediante una modificación del método de Yang *et al.* (1992). Las células de 2 ml de un cultivo de *E. faecium* P13 en un fermentador a pH constante 8,5 se obtuvieron por centrifugación y se trataron a 100°C durante 5 min. A continuación, éstas se lavaron con tampón NaP (pH 6,5) y, seguidamente, se resuspendieron en una solución de NaCl 100mM (pH 2,0). Finalmente, las suspensiones se centrifugaron a 13.000 rpm y 4°C durante 30 min y se recogió el sobrenadante de las células para determinar su actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras.

#### **IV.2.5. INFLUENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P**

Para determinar la influencia del pH en la actividad antimicrobiana de la enterocina P, se resuspendieron alícuotas liofilizadas de sobrenadantes de *E. faecium* P13, obtenidos en las condiciones descritas en la sección IV.2.1, en caldo MRS con el pH ajustado a 4,7; 5,0; 5,3; 5,7; 6,0; 6,2; 7,0 y 8,5. Los sobrenadantes se incubaron a 4°C durante 24 h y, a continuación, se determinó su actividad antimicrobiana mediante un ensayo en placas microtituladoras (sección III.2.2.1) empleando como controles negativos de actividad alícuotas de caldo MRS con el pH ajustado a los mismos valores que los sobrenadantes.

#### **IV.2.6. EFECTO COMBINADO DEL pH Y DE LOS COMPUESTOS ORIGINADOS DURANTE EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 EN MRS EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P**

El efecto combinado del pH y de los metabolitos producidos durante el crecimiento de *E. faecium* P13 en MRS en la inactivación de la actividad antimicrobiana de la enterocina P se determinó empleando sobrenadantes de un cultivo de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C durante 16 h (sección III.2.2.1). Estos sobrenadantes se concentraron 20 veces mediante liofilización y se diluyeron en el sobrenadante de un cultivo de *E. faecium* P13 en fase estacionaria avanzada (24 h), ajustándose su pH final a 4,7; 5,3; 6,0; 7,0 y 8,5. Asimismo, se prepararon controles de dos tipos. El control tipo I se preparó diluyendo el sobrenadante de *E. faecium* P13 (16 h) en un sobrenadante de *E. faecium* P13 (24 h) sometido a un tratamiento térmico de 100°C durante 30 min. El objetivo del tratamiento térmico fue la inactivación de compuestos termolábiles, como, por ejemplo, proteasas secretadas durante el crecimiento del microorganismo productor. El control tipo II se preparó resuspendiendo el sobrenadante de *E. faecium* P13 (16 h) en caldo MRS estéril. A continuación, el pH de las tres muestras se ajustó paulatinamente a 4,7; 5,3; 6,0; 7,0 y 8,5 con HCl y NaOH concentrados. Una vez alcanzados cada uno de los valores de pH deseados, se tomaron alícuotas de las muestras, que se esterilizaron por filtración y se dividieron en 2 fracciones que se incubaron a -20 y 32°C durante 16 h. Finalizada la incubación, se determinó la actividad antimicrobiana de las muestras mediante un ensayo en placas microtituladoras.

#### **IV.2.7. CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P EN CALDO BHI SUPLEMENTADO CON SOBRENADANTES ACTIVOS DE *E. faecium* P13**

A partir de un cultivo de *E. faecium* P13 desarrollado en las condiciones descritas en la sección IV.2.1, se inocularon cinco botellas que contenían 50 ml de caldo BHI (pH 7,2) con aproximadamente  $2,5 \times 10^3$  ufc/ml. Por otra parte, se obtuvo el sobrenadante de un cultivo de *E. faecium* P13 desarrollado en las condiciones citadas y se ajustó su pH a 7,2. A continuación, a tres de las botellas se les adicionaron alícuotas de dicho sobrenadante a las concentraciones finales del 0,1; 1 y 5% (v/v). Como controles, se emplearon un cultivo al que se adicionó caldo MRS al 5% en lugar de sobrenadante y otro al que no se le adicionó sobrenadante ni caldo MRS. A intervalos de 2 h se tomaron muestras de cada uno de los cultivos para determinar su  $DO_{620}$  en un

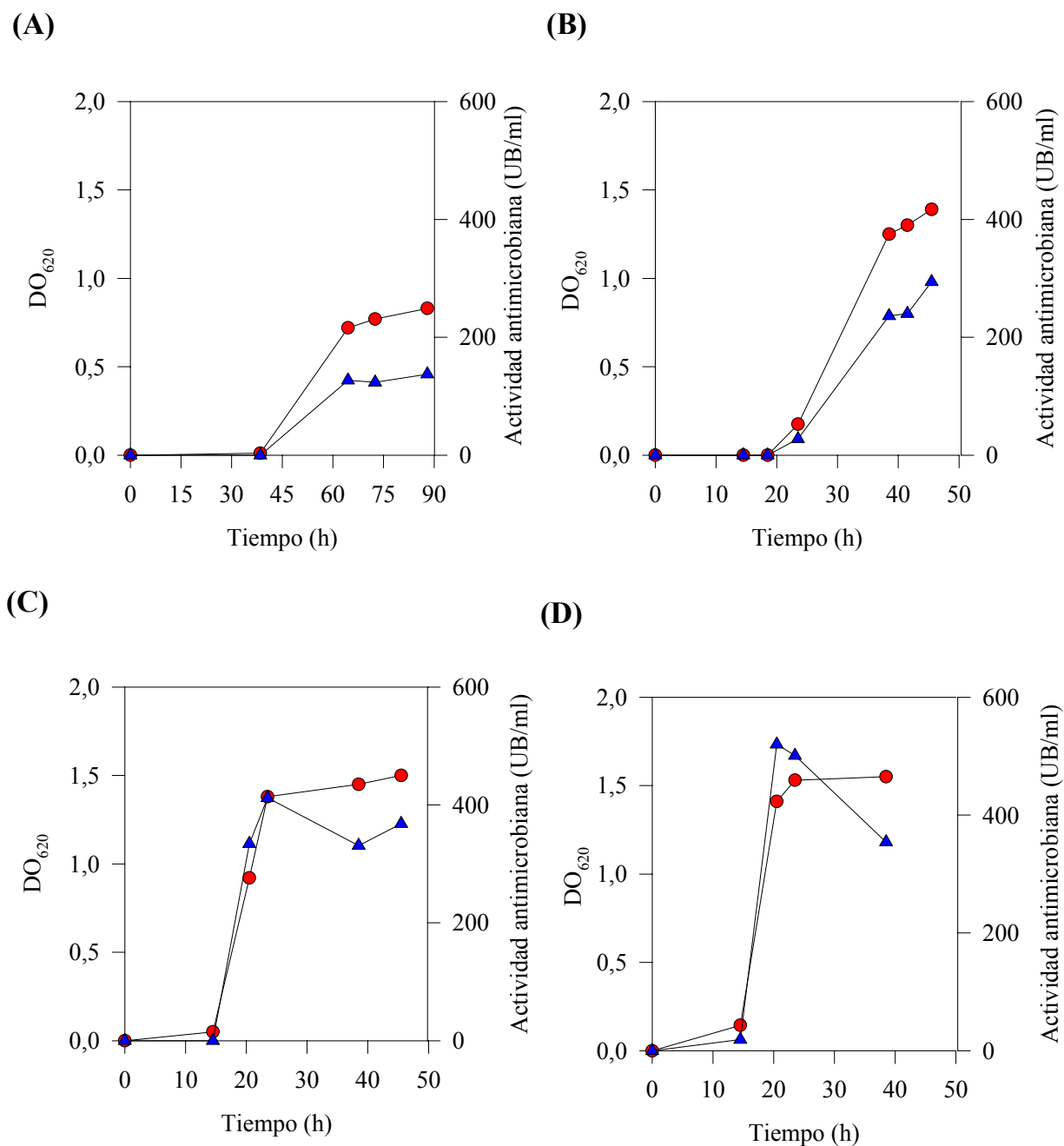
espectrofotómetro, su pH y la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes mediante un ensayo en placas microtituladoras.

### IV.3. RESULTADOS

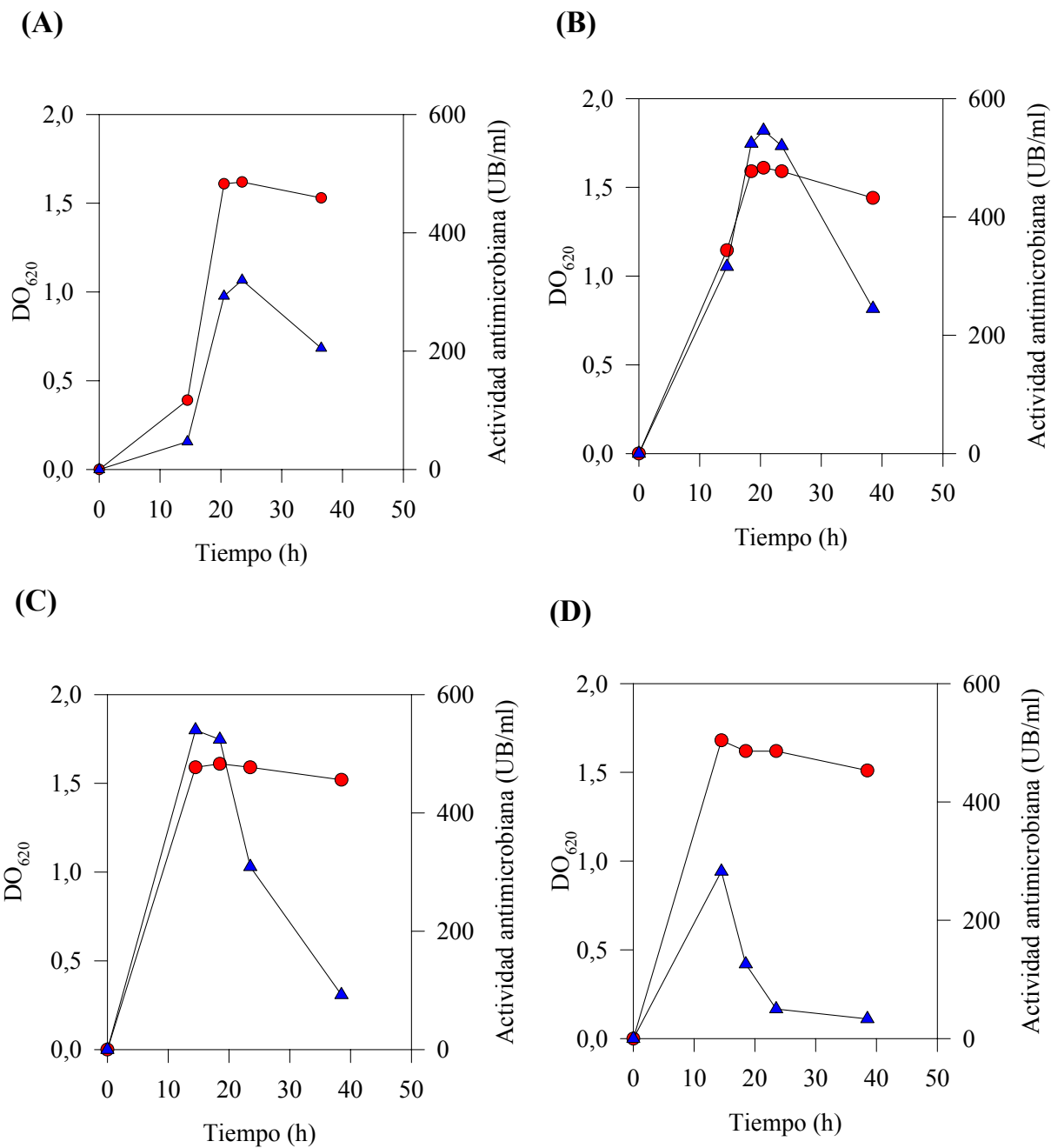
#### IV.3.1. INFLUENCIA DEL pH INICIAL DEL CALDO MRS EN EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y EN LA PRODUCCIÓN/DETECCIÓN DE ENTEROCINA P

La influencia del pH inicial del caldo MRS en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción/detección de la enterocina P se determinó en un intervalo de pH comprendido entre 4 y 8. A valores de pH inferiores a 4,7 no se detectó crecimiento de *E. faecium* P13 durante el curso del experimento (88 h). A valores de pH de 4,7 y superiores, *E. faecium* P13 creció y produjo enterocina P en cantidades variables en función del pH inicial del medio de cultivo. En las Figs. 4.1 y 4.2 se representan la DO<sub>620</sub> de los cultivos y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes en función del tiempo, y en la Fig. 4.3 se comparan las cinéticas de crecimiento de *E. faecium* P13 y de producción de enterocina P a los diferentes valores de pH inicial. El crecimiento fue más rápido a valores de pH cercanos a la neutralidad que a valores de pH ácidos; así, mientras que a las 14 h no se detectó crecimiento en los caldos con pH 4,0 a 5,3, el microorganismo había comenzado a crecer en el resto de los valores de pH, detectándose la DO<sub>620</sub> más alta en el caldo de pH 8,0. La DO<sub>620</sub> final del cultivo de pH 4,7 representó aproximadamente el 50% de la DO<sub>620</sub> máxima (correspondiente a los cultivos de pH inicial 8,0).

En lo que se refiere a la producción de enterocina P, la actividad antimicrobiana máxima se detectó en los sobrenadantes de los cultivos con pH inicial 6,0; 6,5 y 7,0 (520, 546, y 540 UB/ml, respectivamente) a las 20,5; 20 y 14 h, respectivamente. La actividad antimicrobiana máxima coincidió en todos los casos con el final de la fase exponencial y el principio de la fase estacionaria de crecimiento de los cultivos. La menor producción de actividad antimicrobiana se observó en los sobrenadantes del cultivo de pH inicial 4,7. En cuanto a la actividad antimicrobiana específica máxima (actividad antimicrobiana en UB/ml dividida por la DO<sub>620</sub>), ésta correspondió a los cultivos de pH inicial 5,7 y 6,0 (363 y 368 UB/ml, respectivamente), seguida por los cultivos de pH inicial 6,2 y 7,0 (339 UB/ml). A pesar de que los sobrenadantes del cultivo de pH inicial 4,7 presentaron la actividad antimicrobiana absoluta más baja, su actividad antimicrobiana específica fue ligeramente superior a la del cultivo de pH inicial 8,0. En cuanto a la estabilidad de la actividad antimicrobiana, puede observarse que ésta disminuye a medida que aumenta el pH, siendo mínima a pH 8,0. Así, por ejemplo, la actividad antimicrobiana se redujo un 5% en el cultivo de pH 6,0 a las 3 h de alcanzarse el máximo, mientras que en los cultivos de pH 7,0 y 8,0, la reducción de la actividad antimicrobiana a las 5 h de alcanzarse el valor máximo fue del 40 y del 60%, respectivamente.

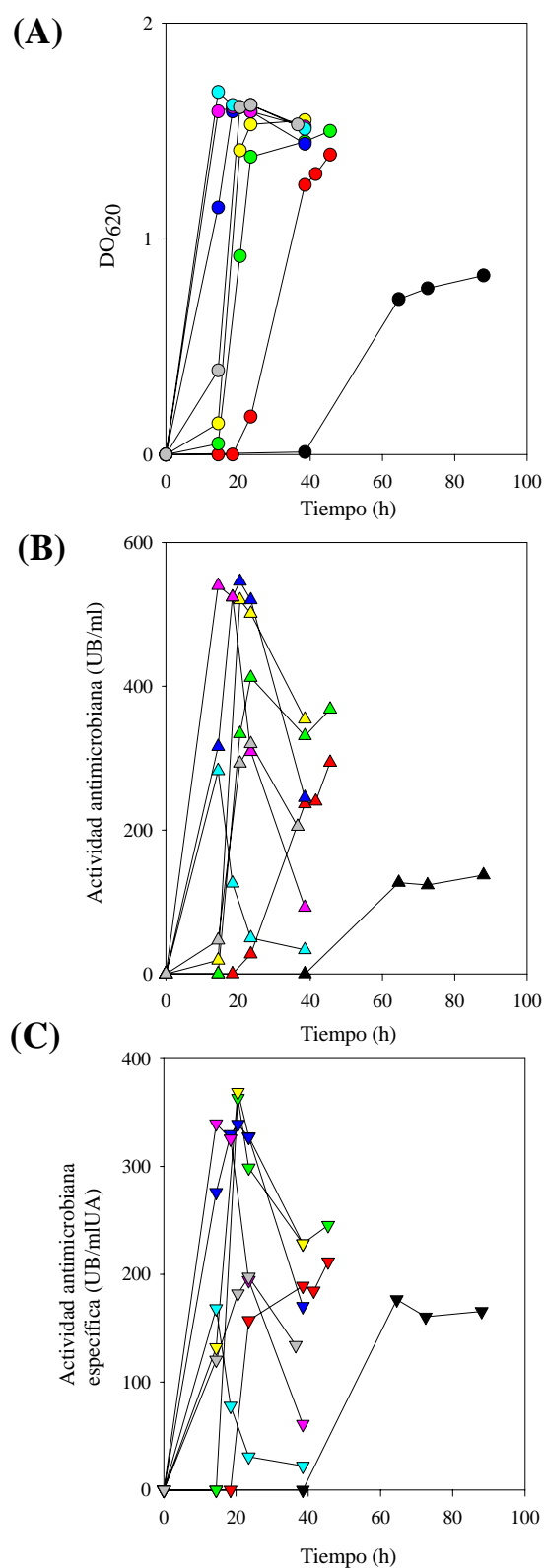


**Fig. 4.1.** Cinéticas de crecimiento (—●—) y producción de enterocina P (—▲—) de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en caldo MRS a un pH inicial de 4,7 (A), 5,3 (B), 5,7 (C) y 6,0 (D).



**Fig. 4.2.** Cinéticas de crecimiento (—●—) y producción de enterocina P (—▲—) de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en caldo MRS a un pH inicial de 6,2 (A), 6,5 (B), 7,0 (C) y 8,0 (D).





**Fig. 4.3.** Comparación de las cinéticas de crecimiento (A), producción de actividad antimicrobiana (B) y actividad antimicrobiana específica (C) de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en caldo MRS a pH inicial 4,7 (símbolos de color negro); 5,3 (símbolos de color rojo); 5,7 (símbolos de color verde); 6,0 (símbolos de color amarillo); 6,5 (símbolos de color azul); 7,0 (símbolos de color rosa) y 8,5 (símbolos de color celeste), y del cultivo control (símbolos de color gris).

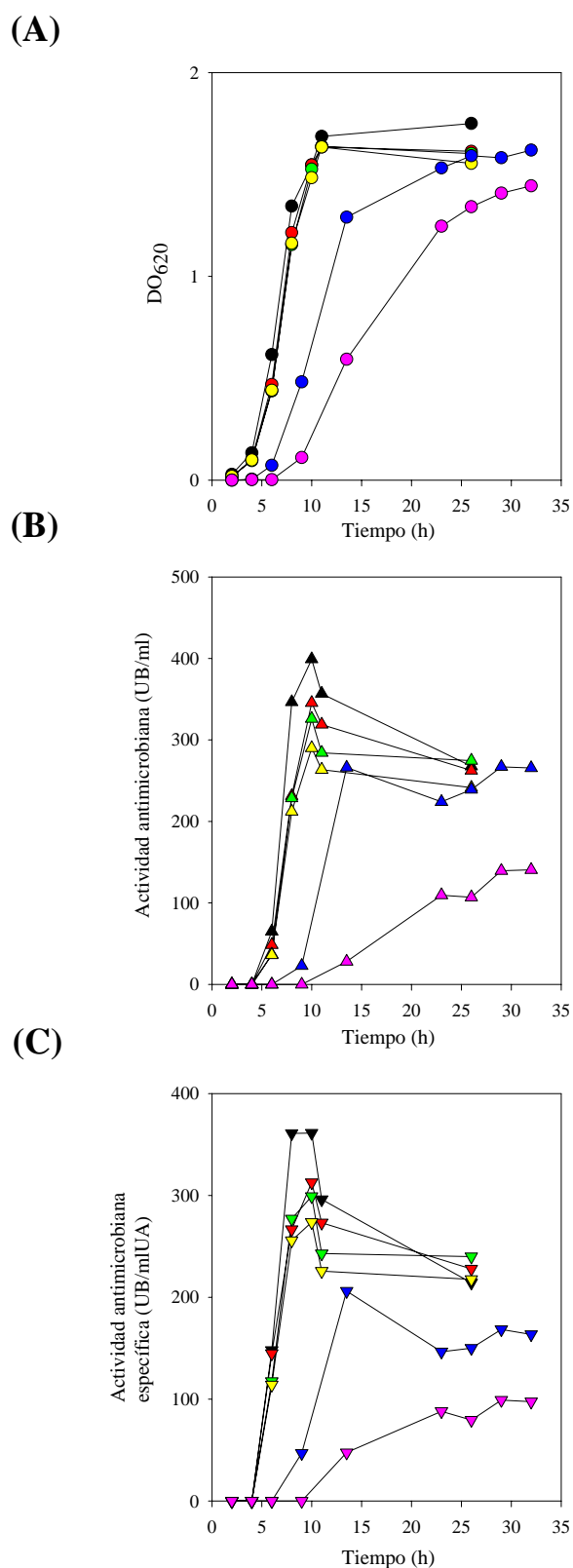
### IV.3.2. INFLUENCIA DEL NaCl Y DEL ETANOL EN EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y EN LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P

Para determinar la influencia del NaCl y del etanol en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de enterocina P se inoculó el microorganismo productor en caldo MRS con NaCl a una concentración final entre 0,5 y 10% (p/v), o con etanol a una concentración final entre 0,5 y 7% (v/v).

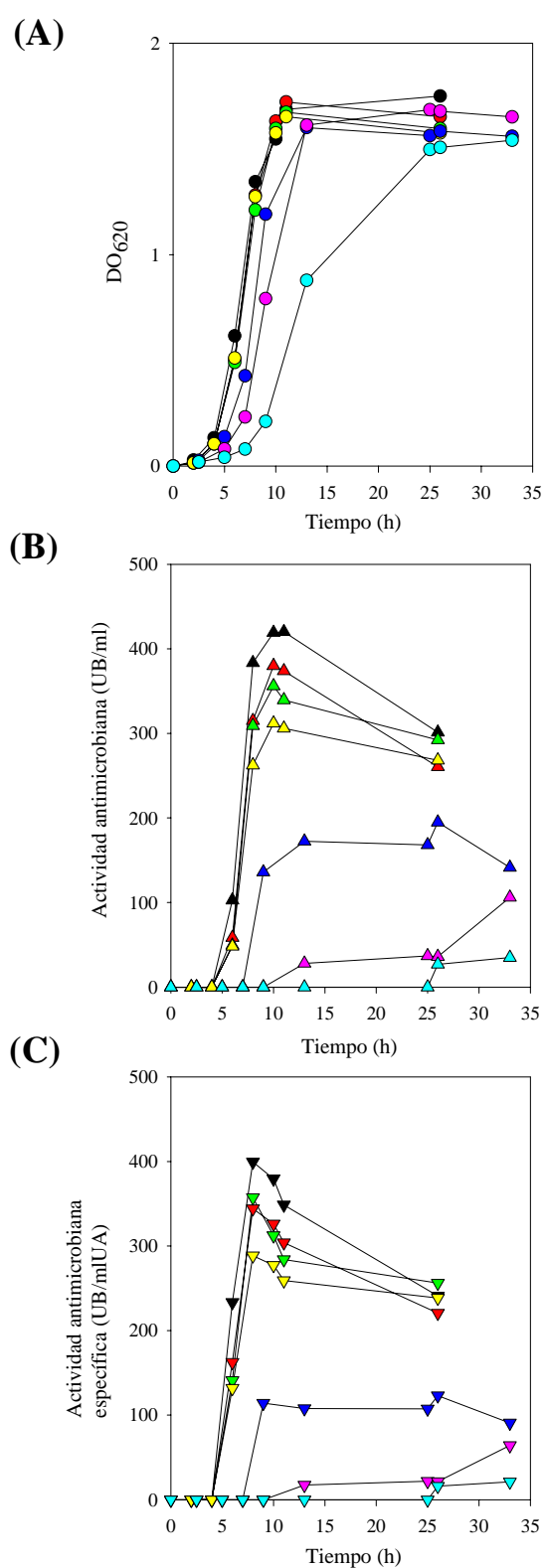
*E. faecium* P13 creció lentamente en presencia de un 8% de NaCl y no mostró crecimiento cuantificable cuando la concentración de sal se incrementó a un 10%. En la Fig. 4.4 se observa que una concentración de sal mayor del 1% afecta negativamente a la  $\mu_{\text{máx}}$  de *E. faecium* P13. Así, la  $\mu_{\text{máx}}$  de los cultivos incubados en presencia de un 3 y un 5% de NaCl representó, respectivamente, el 64 y el 27% de la obtenida para el cultivo control. En cambio, las concentraciones de sal iguales o inferiores al 1% no afectaron negativamente al crecimiento e incluso produjeron un ligero aumento de la  $\mu_{\text{máx}}$  con respecto a la del cultivo control. La actividad antimicrobiana máxima se obtuvo en los cultivos en ausencia de NaCl, observándose una tendencia decreciente a medida que aumentó la concentración de sal. La actividad antimicrobiana específica máxima fue mayor en el cultivo control, detectándose asimismo una tendencia decreciente de ésta a medida que se incrementó la concentración de NaCl.

En lo que se refiere al etanol, el crecimiento de *E. faecium* P13 en el medio con un 7% de este sustrato fue considerablemente inferior al detectado empleando concentraciones menores (por ejemplo, representó el 50% del obtenido tras 24 h de incubación en caldo con un 6% de etanol). El crecimiento no mostró diferencias significativas para concentraciones de etanol comprendidas entre el 0,5 y el 4% (Fig. 4.5), e incluso se observó un ligero incremento de la  $\mu_{\text{máx}}$  de estos cultivos con respecto a la del cultivo control. La actividad antimicrobiana máxima y la actividad antimicrobiana específica máxima se detectaron, como en el caso anterior, en el cultivo control y éstas mostraron una tendencia descendente a medida que aumentó la concentración de etanol.

La  $\mu_{\text{máx}}$  de los cultivos, así como la actividad antimicrobiana máxima y la actividad antimicrobiana específica máxima obtenidas bajo las diferentes condiciones de crecimiento se muestran en la Tabla IV.1.



**Fig. 4.4.** Cinética de crecimiento (A), actividad antimicrobiana (B) y actividad antimicrobiana específica (C) de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C en ausencia de NaCl (símbolos de color negro) o en presencia de un 0,5% (símbolos de color rojo), 0,75% (símbolos de color verde), 1% (símbolos de color amarillo), 3% (símbolos de color azul) y 5% (símbolos de color rosa).



**Fig. 4.5.** Cinética de crecimiento (A), actividad antimicrobiana (B) y actividad antimicrobiana específica (C) de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C en ausencia de etanol (símbolos de color negro) o en presencia de un 0,5% (símbolos de color rojo), 0,75% (símbolos de color verde), 1% (símbolos de color amarillo), 2% (símbolos de color azul), 4% (símbolos de color rosa) y 6% (símbolos de color celeste).

**Tabla IV.1. Influencia del NaCl y del etanol en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de enterocina P.**

	$\mu_{\text{máx}}^1$	AAmáx <sup>2</sup>	AAEmáx <sup>3</sup>
Control	0,578	399	361
<u>NaCl (p/v)</u>			
0,5%	0,620	345	313
0,75%	0,626	326	299
1%	0,618	290	273
3%	0,371	267	206
5%	0,158	140	99
Control	0,578	420	399
<u>Etanol (v/v)</u>			
0,5%	0,625	380	344
0,75%	0,611	356	357
1%	0,624	312	288
2%	0,538	195	123
4%	0,569	106	64
6%	0,389	35	21
<sup>1</sup> Velocidad específica de crecimiento máxima. <sup>2</sup> Actividad antimicrobiana máxima (UB/ml). <sup>3</sup> Actividad antimicrobiana específica máxima (actividad antimicrobiana en UB/ml dividida por la DO <sub>620</sub> ) (UB/ml UA).			

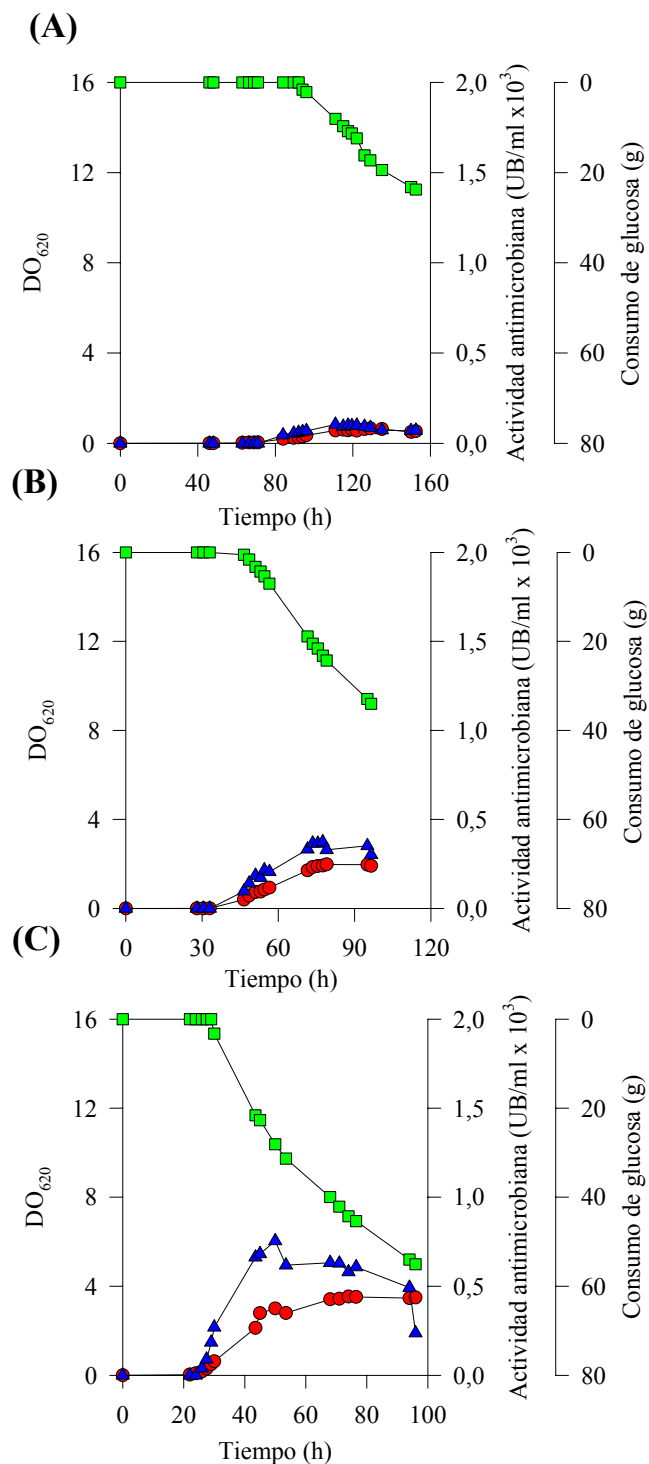
### IV.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* P13

Con el objeto de establecer las condiciones óptimas para la producción de la enterocina P de *E. faecium* P13 en el caldo MRS, este microorganismo se desarrolló en el citado medio a 32°C en anaerobiosis y con agitación moderada (50 rpm) en un fermentador, manteniendo el pH constante a 4,7; 5,0; 5,3; 5,7; 6,0; 6,2; 7,0 y 8,5, así como sin controlarlo externamente (pH inicial 6,2). A intervalos variables, se tomaron muestras del tanque reactor por duplicado bajo condiciones de esterilidad y se determinó su DO<sub>620</sub> y su actividad antimicrobiana.

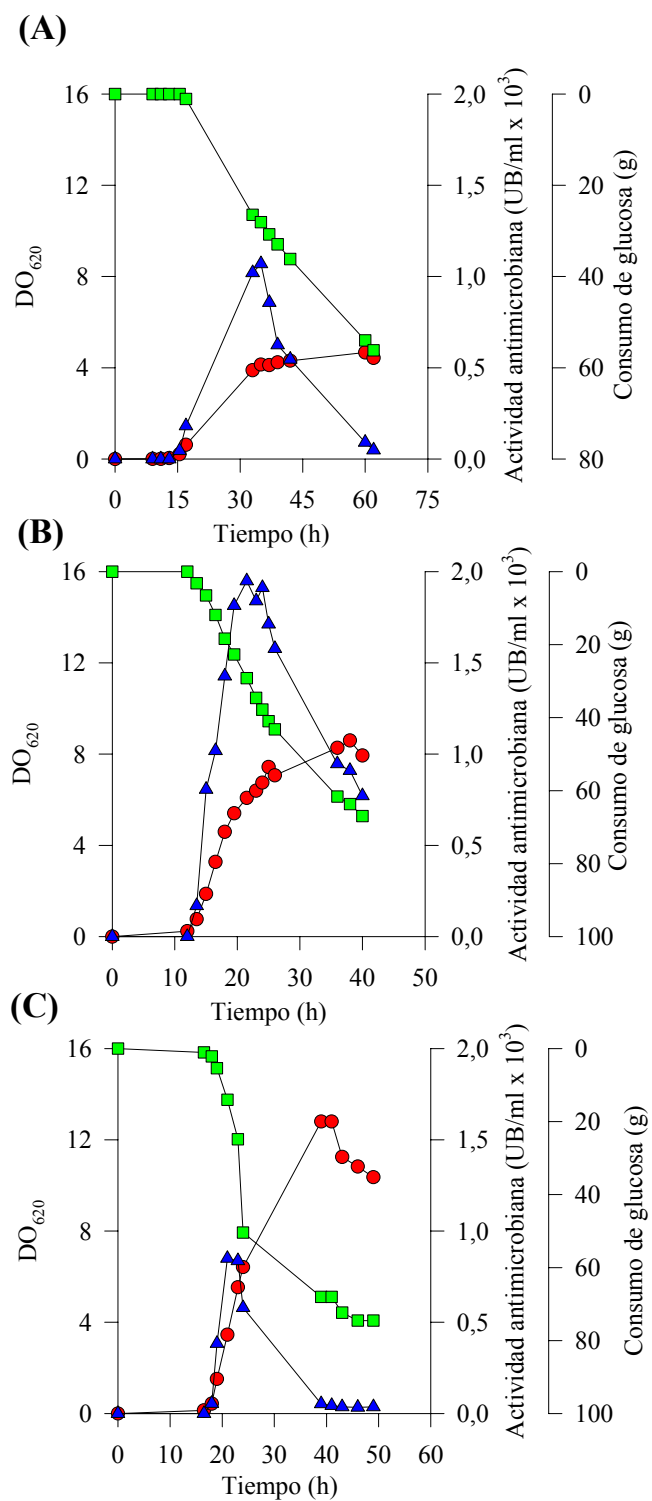
#### IV.3.3.1. Crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa de *E. faecium* P13 desarrollado en un fermentador a pH constante

En las Figs. 4.6 , 4.7 y 4.8 se muestran las cinéticas de crecimiento y producción de enterocina P y el consumo de glucosa de *E. faecium* P13 desarrollado en el fermentador a diferentes valores de pH. La  $\mu_{\text{máx}}$ , la DO<sub>620</sub> máxima de los cultivos, la actividad antimicrobiana máxima y la actividad antimicrobiana específica máxima de los sobrenadantes y el consumo total de glucosa durante el crecimiento de los cultivos se muestran en la Tabla IV.2.

En la Fig. 4.9 se comparan las cinéticas de crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa de los cultivos de *E. faecium* P13 manteniendo el pH constante. La cinética de crecimiento de *E. faecium* P13 mostró diferencias considerables a los diversos valores de pH (Fig. 4.9A). El crecimiento máximo (DO<sub>620</sub> ≈ 14) tuvo lugar a pH 7,0, mientras que el mínimo (DO<sub>620</sub> = 0,66) se obtuvo en un cultivo con el pH ajustado a 4,7 durante 5 días, lo que representó el 700 y 33%, respectivamente, con respecto al crecimiento del cultivo control de pH inicial 6,2 y sin control durante el crecimiento (DO<sub>620</sub> ≈ 2). En cuanto a la  $\mu_{\text{máx}}$ , el máximo (1,48) y el mínimo (0,12) se obtuvieron también a pH 7,0 y 4,7, respectivamente. Las  $\mu_{\text{máx}}$  de los cultivos de pH constante 6,0 y 6,2 y del control fueron muy similares entre sí (≈ 0,9) y ligeramente superiores a las de los cultivos de pH 5,7 y 8,5 (≈ 0,7). Los valores mínimos de  $\mu_{\text{máx}}$  correspondieron a los cultivos de pH 4,7; 5,0 y 5,3.



**Fig. 4.6.** Cinéticas de crecimiento (—●—), producción de enterocina P (—▲—) y consumo de glucosa (—■—) de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 4,7 (A); 5,0 (B) y 5,3 (C).



**Fig. 4.7.** Cinéticas de crecimiento (—●—), producción de enterocina P (—▲—) y consumo de glucosa (—■—) de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 5,7 (A), 6,0 (B) y 6,2 (C)



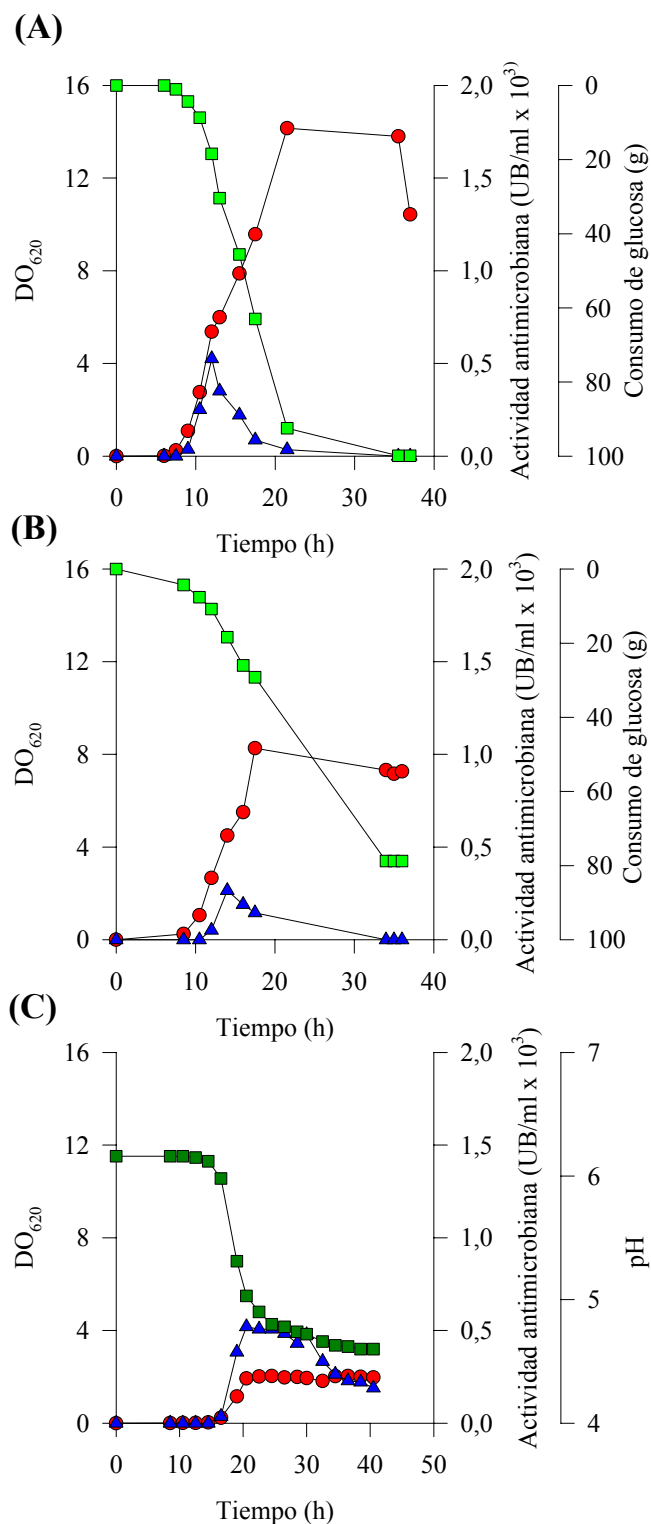
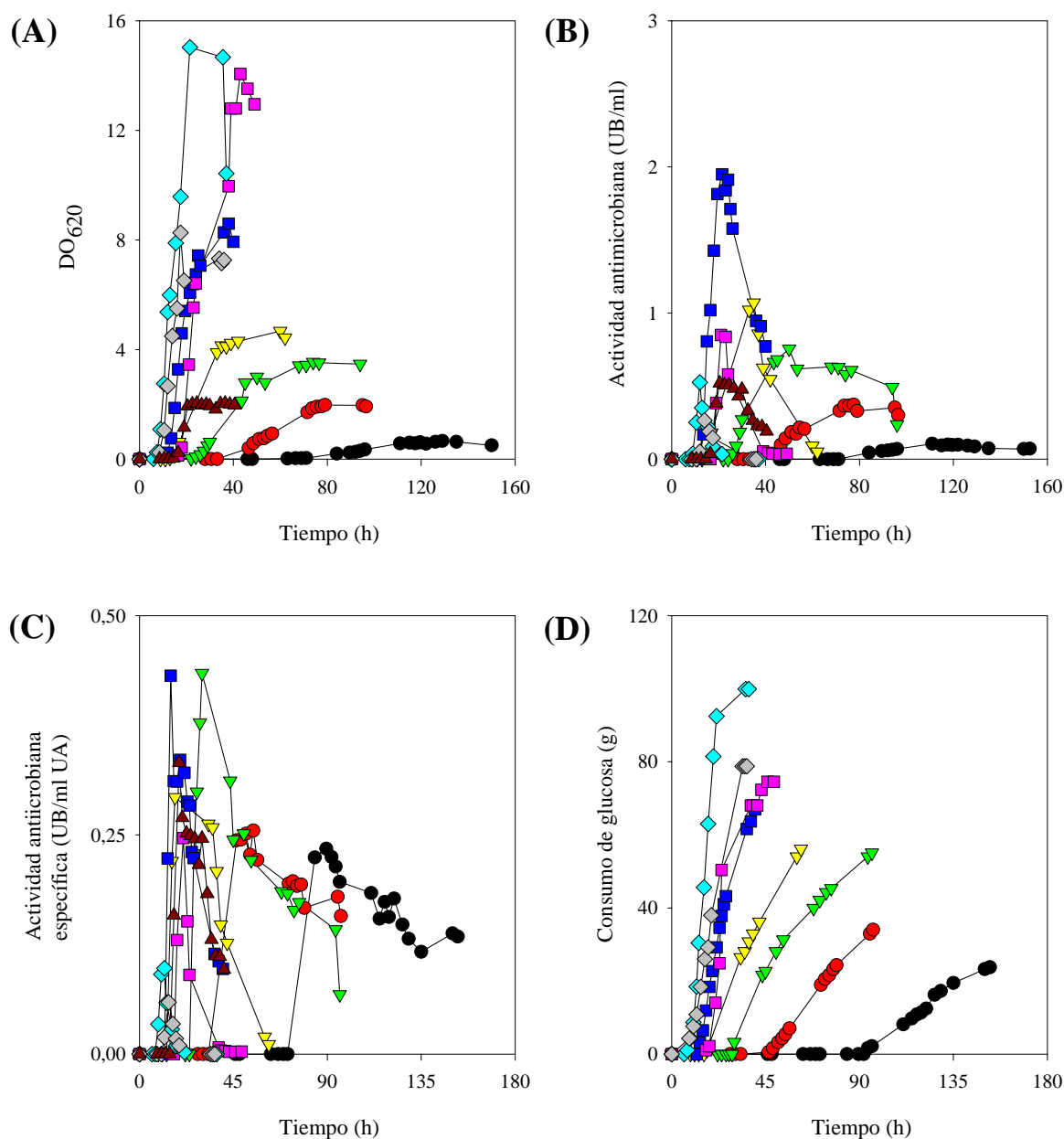


Fig. 4.8. Cinéticas de crecimiento (—●—), producción de enterocina P (—▲—) y consumo de glucosa (—■—) o pH (—■—) de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 7,0 (A) y 8,5 (B) y sin controlarlo (pH inicial 6,2) (C).



**Fig. 4.9.** Comparación de las cinéticas de crecimiento (A), producción de actividad antimicrobiana (B), actividad antimicrobiana específica (C) y consumo de glucosa (D) de *E. faecium* P13 desarrollado en un fermentador a 32°C y pH constante 4,7 (símbolos de color negro); 5,0 (símbolos de color rojo); 5,3 (símbolos de color verde); 5,7 (símbolos de color amarillo); 6,0 (símbolos de color azul); 6,2 (símbolos de color rosa), 7,0 (símbolos de color celeste), y 8,5 (símbolos de color gris). Las cinéticas del cultivo control se representan con símbolos de color marrón.

**Tabla IV.2. Cinética del crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en un fermentador a diferentes valores de pH.**

pH	$\mu_{\text{máx}}$	DO <sub>620</sub> máx	AAmáx	AAEmáx	Glucosa <sup>a</sup>
4,7	0,12	0,66	104	234	24
5,0	0,22	1,98	372	254	34
5,3	0,41	3,53	754	434	55
5,7	0,72	4,67	1.069	293	56
6,0	0,95	8,59	1.949	431	67
6,2	0,90	12,80	850	254	74
7,0	1,48	14,15	525	98	100
8,5	0,78	7,32	265	59	80
6,2 <sup>b</sup>	0,97	2,04	520	332	—

<sup>a</sup>Consumo de glucosa acumulado (g). <sup>b</sup>Fermentación a pH inicial 6,2 y sin regulación durante el crecimiento. Resto de símbolos como en la Tabla IV.1.

Con respecto a la cinética de producción de la enterocina P, la actividad antimicrobiana comenzó a detectarse al inicio de la fase exponencial de crecimiento en todos los casos (Fig. 4.9B); no obstante, la producción máxima y la estabilidad de la enterocina P mostraron diferencias significativas en función del pH de los cultivos. La actividad antimicrobiana máxima se detectó en el cultivo de pH 6,0, seguido de los cultivos de pH 5,7; 6,2; 5,3 y 7,0. En los cultivos de pH 4,7; 5,0 y 8,5 se obtuvo una producción de enterocina P menor que en el control. El máximo de actividad antimicrobiana se alcanzó al final de la fase exponencial del crecimiento a valores de pH de 6,0 e inferiores, así como en el cultivo control, mientras que a pH 6,2 o superior el máximo se obtuvo hacia la mitad de dicha fase. La mayor actividad antimicrobiana específica correspondió a los cultivos de pH 5,3 y 6,0 y, a pesar de que la menor actividad antimicrobiana se obtuvo en el cultivo de pH 4,7, las actividades específicas mínimas correspondieron a los cultivos de pH 7,0 y 8,5 (Fig. 4.9C). En lo que se refiere a la estabilidad de la actividad antimicrobiana, se observó una tendencia a su disminución a pH 5,7 o superior. Así, a pH 7,0 y 8,5 la actividad antimicrobiana desapareció por completo a las 23,5 y 22 h, respectivamente, de haberse detectado el valor máximo.

El consumo de glucosa presentó una dinámica paralela a la cinética de crecimiento, por lo que el valor máximo (aproximadamente 100 g) tuvo lugar a pH 7,0 y el mínimo (28 g) a pH 4,7 (Fig. 4.9D). La glucosa se consumió fundamentalmente durante la fase estacionaria del crecimiento en los cultivos de pH entre 4,7 y 5,7; asimismo, en dicha fase se produjo un descenso drástico del pH en el cultivo de pH no controlado; en cambio, en los cultivos de pH 6,0 y superior, el consumo de glucosa comenzó durante la fase exponencial del crecimiento y continuó durante la fase estacionaria.

#### **IV.3.3.2. Modelado del crecimiento de *E. faecium* P13 en un fermentador con regulación del pH**

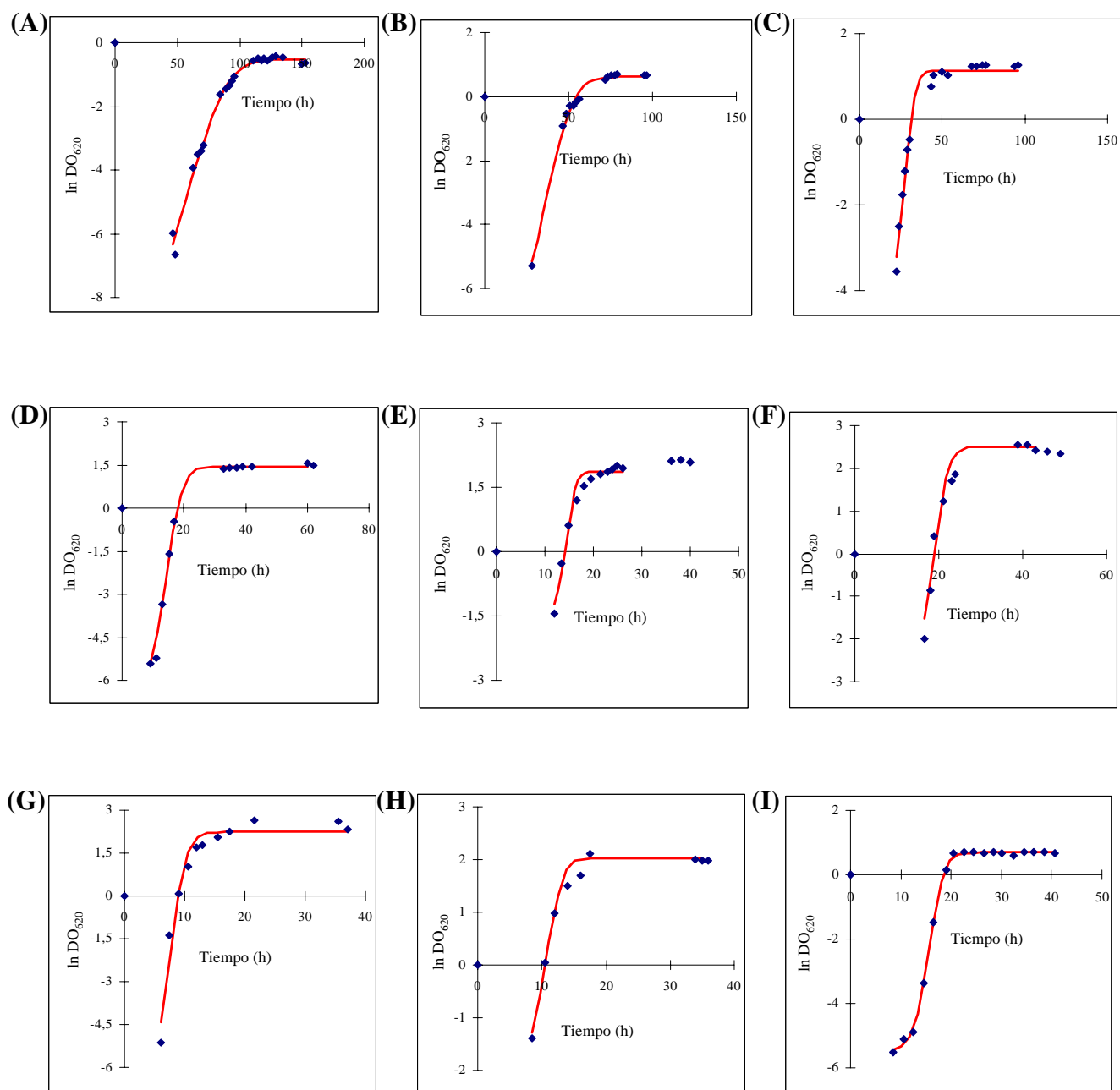
El crecimiento de *E. faecium* P13 en un fermentador bajo condiciones de pH controladas se expresó con el modelo de Baranyi y Roberts (1994) (ecuación (3), sección IV.2.3.1) y se muestra en la Fig. 4.10.

La dependencia de  $\mu_{\text{máx}}$  en función del pH se describió empleando un polinomio de segundo grado, obteniéndose la expresión:

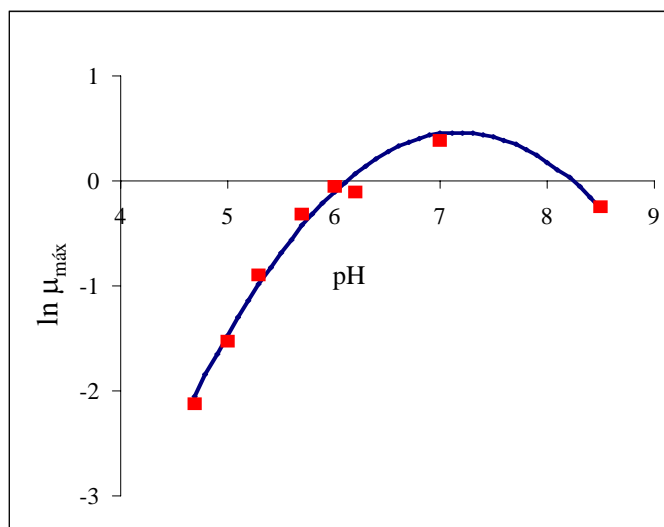
$$\ln \mu_{\text{máx}} = -20,163 + 5,872 \text{ pH} + 0,409 \text{ pH}^2 \quad (\text{Fig. 4.11}) \quad (6)$$

con un  $R^2$  de 0,987 y un error estándar de 0,112.

Como se muestra en la Fig. 4.11, el modelo predice una tendencia creciente de  $\ln \mu_{\text{máx}}$  a medida que aumenta el pH, con un máximo a pH 7,17. Este valor es muy próximo al obtenido experimentalmente (pH 7,0). A partir de este máximo, la  $\mu_{\text{máx}}$  disminuye, alcanzando a pH 8,5 un valor muy similar al obtenido en los cultivos de pH 6,0 y 6,2.



**Fig. 4.10.** Expresión del crecimiento de *E. faecium* P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 4,7 (A); 5,0 (B); 5,3 (C); 5,7 (D); 6,0 (E); 6,2 (F); 7,0 (G); 8,5 (H) y sin regulación del pH (I) mediante el modelo de Baranyi y Roberts (1994).



**Fig. 4.11. Dependencia del  $\ln \mu_{\max}$  con respecto al pH.** En color rojo se muestran los valores de  $\mu_{\max}$  obtenidos experimentalmente; la línea de color azul representa los valores estimados por el modelo para el intervalo de pH comprendido entre 4,7 y 8,5.

### IV.3.3.3. Modelado de la producción de enterocina P y de su inactivación

La producción e inactivación de enterocina P se modelaron empleando las ecuaciones diferenciales (4) y (5) propuestas por Lejeune *et al.* (1998) (sección IV.2.3.2).

Los valores de  $k_b$  y  $k'$  de los cultivos desarrollados con el pH constante en el intervalo comprendido entre 4,7 y 8,5 junto con los del cultivo control se muestran en la Tabla IV.3.

**Tabla IV.3. Parámetros  $k_b$  y  $k'$  de los cultivos de *E. faecium* P13 desarrollados en un fermentador con regulación del pH**

pH	$k_b$	$k'$
4,7	0,195	NR <sup>a</sup>
5,0	0,172	NR
5,3	0,255	NR
5,7	0,259	0,103
6,0	0,386	0,051
6,2	0,454	0,132
7,0	0,172	0,288
8,5	0,089	0,172
Control <sup>b</sup>	0,292	0,055
$k_b$ y $k'$ se calcularon mediante regresión lineal con las ecuaciones (4) y (5). <sup>a</sup> No relevante. <sup>b</sup> Crecimiento a pH inicial 6,2 y sin regulación del pH		

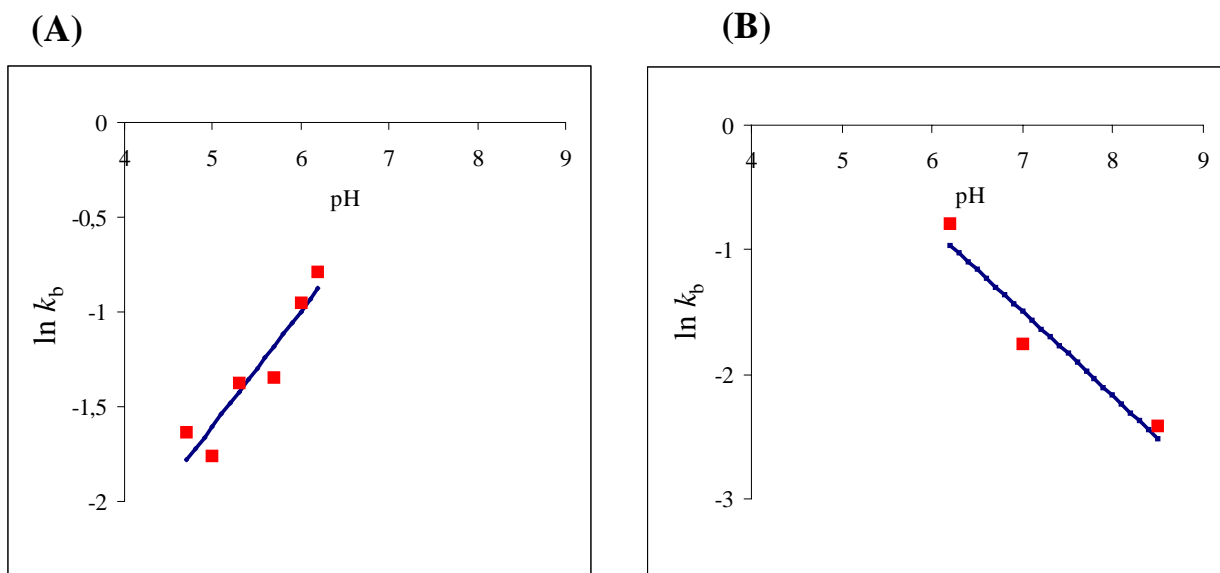
El coeficiente  $k_b$  aumentó con el pH hasta alcanzar su valor máximo a pH 6,2, valor a partir del cual comenzó a descender. En cuanto a  $k'$ , su valor aumentó con el pH de manera similar y alcanzó el máximo a pH 7,0. A pesar de que  $k_b$  es ligeramente mayor a pH 6,2 que a pH 6,0,  $k'$  es aproximadamente el doble al primer pH, lo que explicaría que la actividad antimicrobiana máxima se obtenga a pH 6,0.

La dependencia de  $k_b$  en función del pH se describió mediante una regresión lineal en dos fases:

$$\ln k_b = 0,6042 \text{ pH} - 4,6226, \text{ si } \text{pH} \leq 6,2 \quad (\text{Fig. 4.12A}) \quad (7)$$

$$\ln k_b = -0,6739 \text{ pH} + 3,2182, \text{ si } \text{pH} \geq 6,2 \quad (\text{Fig. 4.12B}) \quad (8)$$

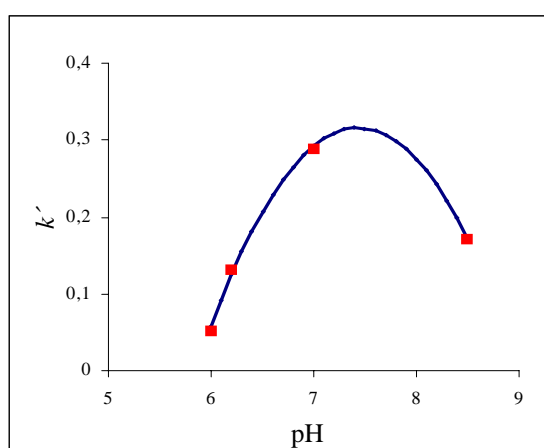
con un  $R^2$  de 0,87 y 0,92 y un error estándar de 0,149 y 0,325 para (7) y (8), respectivamente.



**Fig. 4.12. Dependencia del  $\ln k_b$  con respecto al pH.** En color rojo se muestran los valores de  $k_b$  obtenidos experimentalmente; la línea de color azul representa los valores estimados por el modelo.

La dependencia de  $k'$  en función del pH para valores comprendidos entre 6,2 y 8,5 se describió mediante el polinomio de segundo grado:

$$k' = 0,1254 \text{ pH}^2 + 1,8645 \text{ pH} - 6,615 \quad (\text{Fig. 4.13}) \quad (9)$$



**Fig. 4.13. Dependencia de  $k'$  con respecto al pH.** En color rojo se muestran los valores de  $k'$  obtenidos experimentalmente; la línea de color azul representa los valores estimados por el modelo.



Como conclusiones más interesantes de las cinéticas expuestas puede decirse: (i) que la inactivación de la bacteriocina, estimada por el coeficiente  $k'$ , sigue la misma tendencia que la  $DO_{620\text{máx}}$  (Tabla IV.2) y la  $\mu_{\text{máx}}$  (Fig. 4.10); y (ii) que la tendencia de producción de bacteriocina, estimada a partir de  $k_b$  (Figs. 4.12A y B), es máxima a un pH ligeramente inferior al óptimo para el crecimiento.

#### IV.3.4. ADSORCIÓN DE LA ENTEROCINA P A LAS CÉLULAS DE *E. faecium* P13 Y EXTRACCIÓN DE LA ENTEROCINA P ADSORBIDA

El efecto del pH en la adsorción de la enterocina P a las células de *E. faecium* P13 se determinó empleando una modificación del método descrito por Yang *et al.* (1992). La actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de *E. faecium* P13, incubados a 4°C durante 1 hora en presencia de células en un intervalo de pH comprendido entre 2,0 y 8,5, así como la de los controles tipo II (que contenían tampón en lugar de células) se muestra en la Tabla IV.4.

**Tabla IV.4. Influencia del pH en la adsorción de la enterocina P a las células de *E. faecium* P13.**

pH	Actividad antimicrobiana <sup>a</sup>	
	Ensayo <sup>b</sup>	Control II <sup>c</sup>
2,0	295	319
4,7	264	208
5,0	263	243
5,3	282	252
5,7	273	251
6,0	289	244
6,2	273	250
7,0	307	273
8,5	319	284
<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana (UB/ml). <sup>b</sup> Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes incubados en presencia de células (ensayo). <sup>c</sup> Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes incubados en ausencia de células (controles tipo II).		

Los controles tipo I (con MRS en lugar de sobrenadante) no mostraron actividad antimicrobiana en ningún caso. Los controles tipo II (sin células) mostraron una actividad antimicrobiana ligeramente superior a la de los sobrenadantes en presencia de células en todos los casos, excepto a pH 2,0. Así, los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones ensayadas, no se detecta la adsorción de la enterocina P a las células de *E. faecium* P13.

En cuanto a los experimentos de extracción de enterocina P de células de *E. faecium* P13 desarrolladas en un fermentador a pH constante 8,5, no fue posible obtener actividad antimicrobiana de dichas células tras el proceso de deadsorción en presencia de NaCl 100 mM (pH 2).

#### IV.3.5. INFLUENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P

La influencia del pH en la actividad antimicrobiana de la enterocina P se determinó empleando sobrenadantes de *E. faecium* P13 liofilizados y resuspendidos en tampón NaP 5mM (pH, 4,7; 5,0; 5,3; 5,7; 6,0; 6,2; 7,0 y 8,5) e incubados a 4°C durante 24 h.

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes ajustados a los distintos valores de pH aparece en la Tabla IV.5. Como puede observarse, la actividad antimicrobiana no mostró diferencias significativas para los valores de pH comprendidos entre 4,7 y 6,2 y fue ligeramente inferior en los sobrenadantes resuspendidos en los tampones de pH 7,0 y 8,5.

<b>Tabla IV.5. Influencia del pH en la actividad antimicrobiana de la enterocina P</b>	
<b>pH</b>	<b>Actividad antimicrobiana<sup>a</sup></b>
4,7	453
5,0	439
5,3	422
5,7	424
6,0	455
6,2	405
7,0	376
8,5	394
<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes (UB/ml). Los valores representan la media de dos experimentos independientes	

#### IV.3.6. EFECTO COMBINADO DEL pH Y DE LOS COMPUESTOS ORIGINADOS DURANTE EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 EN CALDO MRS EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENTEROCINA P

En la Tabla IV.6 se muestra la actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de *E. faecium* P13 incubados a 32°C durante 16 h en presencia del sobrenadante tratado térmicamente y sin tratar de un cultivo de 24 h de *E. faecium* P13, así como en caldo MRS estéril, a diversos valores de pH. La actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes incubados en presencia de los sobrenadantes tratado y sin tratar no difirió significativamente de la de los sobrenadantes incubados en caldo MRS. La mayor disminución de actividad antimicrobiana (menor retención de la actividad antimicrobiana inicial) se observó a pH 8,5; dado que la tasa de degradación fue mayor en presencia de caldo MRS que en el sobrenadante sin tratar y tratado térmicamente, no es posible atribuir la disminución de la actividad antimicrobiana al efecto de compuestos producidos durante el crecimiento de *E. faecium* P13. Además, puesto que la disminución de actividad antimicrobiana fue superior en presencia del sobrenadante tratado térmicamente, las sustancias termolábiles del medio de cultivo como, por ejemplo, las proteasas, tampoco afectarían considerablemente a la disminución de la actividad antimicrobiana.

**Tabla IV.6. Actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de *E. faecium* P13 a diversos valores de pH.**

pH	Actividad antimicrobiana (%) <sup>a</sup>		
	SB 1 <sup>b</sup>	SB 2 <sup>c</sup>	MRS <sup>d</sup>
4,7	98	95	96
5,3	99	100	100
6,0	97	93	96
7,0	99	100	95
8,5	92	89	85

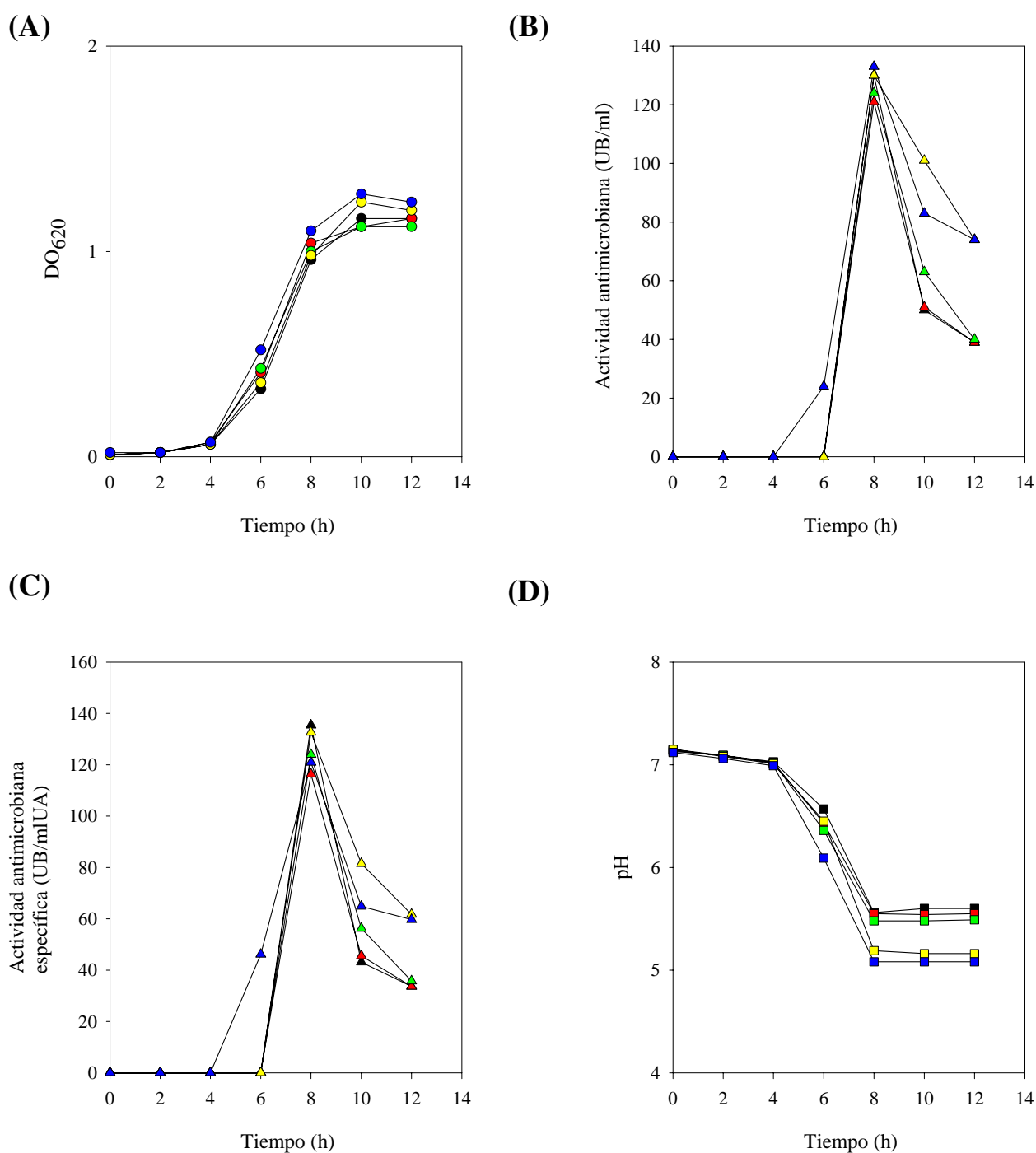
<sup>a</sup> Actividad antimicrobiana residual determinada mediante un ensayo en placas microtituladoras y expresada como el porcentaje de actividad antimicrobiana retenida tras la incubación con respecto a la original. <sup>b</sup> Sobrenadantes diluidos en un sobrenadante no tratado térmicamente. <sup>c</sup> Sobrenadantes diluidos en un sobrenadante tratado térmicamente; <sup>d</sup> Sobrenadantes diluidos en caldo MRS estéril.

#### IV.3.7. CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P EN CALDO BHI SUPLEMENTADO CON SOBRENADANTES ACTIVOS DE *E. faecium* P13

Con el objetivo de determinar el efecto de sobrenadantes con actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 en el crecimiento de dicha cepa y en la producción de enterocina P en caldo BHI, dicho medio se suplementó con sobrenadantes de *E. faecium* P13 (con una actividad antimicrobiana aproximada de 450 UB/ml) con el pH ajustado a 7,2 a una concentración final del 0,1; 1 y 5% (v/v).

La DO<sub>620</sub>, la actividad antimicrobiana y la evolución del pH de los diferentes cultivos se muestra en la Fig.4.14. Como puede observarse, el crecimiento máximo se alcanzó a las 10 h (excepto en el cultivo con sobrenadante al 0,1%, donde se alcanzó a las 12 h) y fue ligeramente superior en los cultivos que contenían un 5% de sobrenadante y un 5% de MRS. La actividad antimicrobiana máxima fue muy similar en todos los cultivos; no obstante, la estabilidad de dicha actividad difirió significativamente: así, a las 2 h de alcanzarse el valor máximo, la actividad antimicrobiana se redujo al 38, 42 y 51% del máximo obtenido en el cultivo control y en aquellos a los que se adicionó un 0,1 y un 1% de sobrenadante, respectivamente, mientras que los cultivos con un 5% de sobrenadante y un 5% de MRS conservaron el 77 y el 62% de la actividad antimicrobiana máxima, respectivamente. Transcurridas 4 h desde que se obtuvo la máxima actividad antimicrobiana, los cultivos con un 5% de sobrenadante y un 5% de MRS conservaron el 56% de dicha actividad, mientras que en el resto de los cultivos este porcentaje representó únicamente el 30%. En lo que respecta a la actividad antimicrobiana específica, ésta fue máxima en los cultivos control y en el suplementado con el 5% de sobrenadante; la actividad antimicrobiana mostró una mayor estabilidad en los cultivos con el 5% de sobrenadante y el 5% de MRS.

En cuanto a la evolución del pH en los diferentes cultivos, éste descendió desde un valor inicial de 7,1 a 5,08 y 5,16 en los cultivos con un 5% de sobrenadante y un 5% de MRS, respectivamente; en cambio, el descenso fue menos pronunciado en el resto de los cultivos, alcanzándose valores de pH final de 5,60; 5,55 y 5,49 en los cultivos control y en los que se adicionó un 0,1 y un 1% de sobrenadante, respectivamente.



**Fig. 4.14.** Cinética de crecimiento (A), actividad antimicrobiana (B), actividad antimicrobiana específica (C) y pH (D) de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo BHI a 32°C en ausencia de sobrenadantes activos de *E. faecium* P13 (símbolos de color negro) o en presencia de un 0,1% (símbolos de color rojo), 1% (símbolos de color verde) y 5% (símbolos de color amarillo), y en caldo BHI suplementado con MRS al 5% (símbolos de color azul)

## IV.4. DISCUSIÓN

### IV.4.1. INFLUENCIA DEL pH INICIAL DEL CALDO MRS Y DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl Y ETANOL EN EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 Y EN LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P

En todos los ensayos de actividad antimicrobiana realizados en este trabajo se empleó como control interno una muestra con una actividad antimicrobiana conocida (sección IV.1.1). La aplicación de un factor de corrección a los resultados obtenidos en distintas fermentaciones o empleando distintas placas microtituladoras permitió determinar las diferencias de actividad antimicrobiana debidas a la influencia de las condiciones medioambientales ensayadas. En este contexto, diversos investigadores han señalado la dificultad existente para comparar los resultados de actividad antimicrobiana con los de otros grupos, debido tanto a los diferentes métodos empleados en la determinación de dicha actividad como a la escasa reproducibilidad de las medidas obtenidas en experimentos realizados en días distintos (Parente y Hill, 1992c; Parente *et al.*, 1994; Blom *et al.*, 1997). Otros autores opinan que la realización de todos los ensayos de actividad antimicrobiana por la misma persona podría proporcionar una mejor reproducibilidad de los títulos de actividad antimicrobiana (Leroy y De Vuyst, 1999a).

*E. faecium* P13 se desarrolló y produjo enterocina P en caldo MRS con un pH inicial comprendido entre 4,7 y 8,0 (Figs. 4.1 y 4.2, sección IV.3.1). El crecimiento máximo se obtuvo en el caldo MRS con un pH inicial de 8,0, mientras que la actividad antimicrobiana máxima correspondió a los cultivos de pH inicial 6,0-7,0. Sin embargo, la actividad antimicrobiana específica fue máxima en los cultivos de pH 5,7 y 6,0. Las diferencias observadas en la producción y estabilidad de la enterocina P en función del pH ensayado proporcionaron la base para el planteamiento de la optimización de la producción de dicha bacteriocina mediante el desarrollo de *E. faecium* P13 en un fermentador controlando el pH de los cultivos. El efecto del pH sobre el crecimiento, la producción de enterocina P y su estabilidad se discuten detalladamente en la sección siguiente.

La influencia del NaCl en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de enterocina P se determinó empleando concentraciones de sal de entre el 0,5 y el 10% (p/v) (Fig. 4.4, sección IV.3.2). *E. faecium* P13 resultó bastante tolerante a la sal, ya que creció y produjo enterocina P incluso a una concentración de NaCl del 5%. En general, las bacterias lácticas homofermentativas son más resistentes al NaCl que las heterofermentativas (Leroy y De Vuyst, 1999b). Además una de

las características típicas del género *Enterococcus* es su capacidad para crecer en presencia de una alta concentración de sal (6,5% NaCl, p/v) (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; Devriese *et al.*, 1993; Hardie y Whiley, 1997).

Cuando *E. faecium* P13 se cultivó en presencia de concentraciones de NaCl iguales o inferiores al 1%, la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) fue ligeramente superior a la del cultivo control (ausencia de NaCl); no obstante, la actividad antimicrobiana máxima y la actividad antimicrobiana específica máxima correspondieron al cultivo control, presentando éstas una reducción del 60% en los cultivos con un 5% de NaCl. El efecto de la sal en el crecimiento de las bacterias lácticas y en la producción de bacteriocinas es variable, aunque, en general, su crecimiento resulta inhibido por concentraciones de NaCl superiores al 3% (Leroy y De Vuyst, 1999b). Así, por ejemplo, la producción de enterocina A por *E. faecium* CTC492 disminuyó en presencia de concentraciones de sal superiores al 3% (Nilsen *et al.*, 1998) y la producción de las enterocinas A y B por la misma cepa resultó fuertemente inhibida por la adición de una mezcla de sal (2,5% p/p) y pimienta negra (0,3%, p/p) (Aymerich *et al.*, 2000b). Por otra parte, el crecimiento de *Lb. amylovorus* DCE471, *Lb. sakei* CTC494 y *Lb. sakei* CCUG 42687 y su producción de amilovorina L471, sakacina K y sakacina P, respectivamente, decrecieron en presencia de concentraciones crecientes de NaCl (De Vuyst *et al.*, 1996; Leroy y De Vuyst, 1999b; Møretrø *et al.*, 2000). El efecto negativo de la sal en la producción de bacteriocinas podría deberse a su influencia negativa en la unión del factor de inducción a su receptor (Nilsen *et al.*, 1998), o bien, a la disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ) del medio, ya que otras sustancias osmóticas, como la sacarosa, el KCl o el glicerol también ocasionan una inhibición del crecimiento y/o la producción de bacteriocinas (Leroy y De Vuyst, 1999b; Uguen *et al.*, 1999). A pesar de que la sal puede reducir la producción de bacteriocinas por bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores, se trata de un ingrediente imprescindible en los procesos de curado. En cualquier caso, la actividad antimicrobiana producida podría ser suficiente para ejercer un efecto inhibidor del crecimiento de microorganismos patógenos y/o alterantes de los alimentos (Hugas *et al.*, 1995; Leroy y De Vuyst, 1999b; Aymerich *et al.*, 2000b), e incluso podría existir un efecto antagonista sinérgico entre la sal y la bacteriocina.

Por otra parte, el NaCl ejerce un efecto estimulante en la producción de sakacina P por *Lb. sakei* LTH673 (Gänzle *et al.*, 1996), plantaricina S por *Lb. plantarum* LPCO10 (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993) y lacticina 481 por *L. lactis* subsp. *lactis* ADRIA 85LO30 (Uguen *et al.*, 1999). En el último caso, concentraciones de sal de 0,2 y 0,4 M incrementaron la producción de bacteriocina 4 y 2,5 veces, respectivamente, a pesar de que la tasa de crecimiento y el rendimiento celular

disminuyeron un 70% en presencia de 0,4 M de NaCl, y de que un 0,5 M de NaCl inhibió completamente el crecimiento del microorganismo productor. En *L. lactis* subsp. *lactis* ADRIA 85LO, el principal soluto citoplasmático acumulado en presencia de sal es el ácido láctico, que no es capaz de contrarrestar la presión osmótica creada por la sal. Cuando este microorganismo creció en presencia de NaCl 0,4 M junto con el agente osmoprotector glicina-betaína no se observó un efecto estimulante de la producción de lacticina 481. Dado que, a diferencia del ácido láctico, el agente osmoprotector es capaz de restablecer una turgencia adecuada en las células, es posible que las condiciones no favorables para el crecimiento, como la alteración de la turgencia celular, estimulen la producción de la bacteriocina. En este sentido, De Vuyst *et al.* (1996) señalaron que la producción de bacteriocinas está estimulada en algunos casos por factores estresantes (por ejemplo, temperaturas bajas, tasas específicas de crecimiento bajas y compuestos potencialmente inhibidores como el NaCl, el etanol y el oxígeno), lo que puede deberse a que, bajo condiciones de crecimiento desfavorables, la producción de ácido láctico puede ser insuficiente para competir eficazmente frente a otros microorganismos.

Con respecto a la acción del etanol (Fig. 4.5 , sección IV.3.2), se observó un ligero incremento de la  $\mu_{\text{máx}}$  de los cultivos desarrollados en presencia del 0,5 al 4% (v/v) de dicho sustrato en comparación con la del cultivo control. La actividad antimicrobiana máxima total y la específica se detectaron en el cultivo control, representando la actividad antimicrobiana específica del cultivo con el 6% de etanol únicamente el 6% de la del control. Al igual que en el caso de la sal, el efecto del etanol en el crecimiento y la producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas puede tener una repercusión positiva o negativa. Nilsen *et al.* (1998) encontraron que la producción de enterocina A por *E. faecium* CTC492 disminuía en presencia de concentraciones de etanol superiores al 5% (v/v), probablemente como consecuencia del mismo mecanismo propuesto para explicar el efecto negativo de la sal; asimismo, el crecimiento de *Lb. sakei* CCUG 42687 y su producción de sakacina P disminuyeron en presencia de etanol (Møretrø *et al.*, 2000). En cambio, la producción de lactocina S por *Lb. sakei* L45 y de amilovorina L471 por *Lb. amylovorus* DCE471 se vio estimulada por una concentración de etanol del 1% (v/v) (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; De Vuyst *et al.*, 1996). Existen diversas hipótesis que tratan de explicar la acción del etanol sobre la producción/detección de las bacteriocinas, entre las que se encuentran: (i) la prevención de la agregación de las moléculas; (ii) la estabilización de la bacteriocina o de las proteínas que participan en su producción y/o (iii) la estimulación de la expresión de los genes del operón de la bacteriocina. En este contexto, se ha observado que para ejercer su acción en la producción de la



actividad antimicrobiana, el etanol debe estar presente durante el crecimiento del microorganismo productor, a pesar de no ser metabolizado. Asimismo, se ha comprobado que la adición de etanol a una solución de bacteriocina no incrementa su actividad (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995). Ambos hechos indican que la agregación, en caso de producirse, ocurriría de manera progresiva e irreversible. Por otra parte, la posibilidad de que, como resultado de las condiciones ambientales, se altere la expresión génica de ciertas bacteriocinas es lógica desde el punto de vista ecológico. En este sentido, la producción de bacteriocinas puede considerarse como un proceso que, aparentemente, tiene como única función la inhibición del desarrollo de la microflora que compite por los sustratos limitantes, especialmente en condiciones ambientales estresantes (Nes y Eijsink, 1999).

#### **IV. 4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P MEDIANTE EL CRECIMIENTO DE *E. faecium* P13 BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE pH EN UN FERMENTADOR.**

##### **IV.4.2.1. Crecimiento de *E. faecium* P13 y producción de enterocina P en un fermentador sin regulación del pH**

La producción de enterocina P por *E. faecium* P13 en caldo MRS en un fermentador sin regulación del pH fue de aproximadamente 500 UB/ml (Fig. 4.8C, sección IV.3.3). Esta producción se aproxima a la de las carnobacteriocinas BM1 y B2 (400 UB/ml) y a la de la lactocina S (200-400 UB/ml) en cultivos de *Cb. piscicola* LV17B y *Lb. sakei* L45, respectivamente, en los que no se había controlado el pH (Quadri *et al.*, 1994; Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995) y está de acuerdo con la observación de que la producción de bacteriocinas se sitúa frecuentemente por debajo de 1.000 UB/ml cuando no se controla el pH (Kaiser y Montville, 1993).

Las diferencias de crecimiento de *E. faecium* P13 y producción de enterocina P observadas a los distintos valores de pH inicial ensayados (sección anterior), junto con el hecho de que la producción de numerosas bacteriocinas se incrementa controlando el pH de los cultivos (Barefoot y Klaenhammer, 1984; Joerger y Klaenhammer, 1986; Muriana y Klaenhammer, 1987; Biswas *et al.*, 1991; De Vuyst y Vandamme, 1992; Daba *et al.*, 1993; Kaiser y Montville, 1993; Barefoot *et al.*, 1994; Parente y Ricciardi, 1994; Parente *et al.*, 1994; ten Brink *et al.*, 1994; Yang y Ray, 1994; Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; Bárcena *et al.*, 1998; Casaus, 1998; Krier *et al.*, 1998)

permitieron hipotetizar que sería posible optimizar la producción de enterocina P mediante el crecimiento de *E. faecium* P13 en un fermentador con regulación del pH.

#### **IV.4.2.2. Condiciones de los cultivos de *E. faecium* P13 en un fermentador con regulación del pH**

##### **IV.4.2.2.1 Temperatura**

Casaus (1998) determinó las cinéticas de crecimiento y producción de enterocina P en cultivos de *E. faecium* P13 con el pH no controlado y observó que, aunque el crecimiento máximo tenía lugar a 37°C, la producción máxima de actividad antimicrobiana se obtenía a 32°C. Por lo tanto, en todas las fermentaciones de *E. faecium* P13 realizadas en este trabajo se seleccionó 32°C como temperatura de incubación. La temperatura óptima para el crecimiento y la producción de bacteriocinas por diversas cepas de bacterias lácticas bacteriocinogénicas es muy variable, oscilando desde los 25°C para el crecimiento de *Lb. sakei* CTC494 y la producción de sakacina K (Leroy y De Vuyst, 1999a) hasta los 37°C para el crecimiento de *Lb. amylovorus* DCE 471 (De Vuyst *et al.*, 1996) y los 37-40°C para la producción de mesentericina 5 por *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UL5 (Daba *et al.*, 1993).

En varias ocasiones se ha observado que la máxima actividad antimicrobiana específica se obtiene a temperaturas subóptimas de crecimiento (Paynter *et al.*, 1997; Krier *et al.*, 1998; Lejeune *et al.*, 1998) y que ciertas condiciones estresantes, como las causadas por un cambio de temperatura, pueden estimular la producción de bacteriocinas (De Vuyst *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1998). En general, a mayor temperatura, mayor es la velocidad específica de crecimiento, lo que representa un mayor consumo de energía de mantenimiento, esto es, energía empleada en procesos de renovación de macromoléculas –como el RNAm– y en el mantenimiento del gradiente de protones a ambos lados de la membrana plasmática (Leroy y De Vuyst, 1999a).

Por otra parte, la temperatura puede ejercer en algunas ocasiones un efecto sobre la estabilidad de la actividad antimicrobiana; así, por ejemplo, la estabilidad de la enterocina P y de la sakacina K disminuye a medida que aumenta la temperatura de incubación (Casaus, 1998; Leroy y De Vuyst, 1999a). Sin embargo, la tasa de inactivación de la amilovorina L471 es independiente de la temperatura en el intervalo de 30 a 45°C, lo que sugiere que se trata de un proceso dependiente de la propia molécula y no de las células productoras (Lejeune *et al.*, 1998).

#### IV.4.2.2.2. Tensión de oxígeno

Diversos investigadores han observado un efecto negativo del oxígeno en la producción y/o estabilidad de las bacteriocinas (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; Chinachoti *et al.*, 1997). Teniendo en cuenta estos resultados, y el hecho de que *E. faecium* P13 es un microorganismo microaerófilo, las fermentaciones se realizaron en condiciones de anaerobiosis.

#### IV.4.2.2.3. Medio de cultivo

Casaus (1998) determinó el efecto de 11 medios de cultivo, entre los que se encontraban medios de composición compleja [APT, BHI, MRS y TSB (caldo triptona soja)], medios semidefinidos y agua de peptona, en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de enterocina P y demostró que, entre éstos, el MRS era el medio de cultivo óptimo. Varios autores han señalado la necesidad de utilizar medios de composición compleja, capaces de soportar una tasa de crecimiento razonablemente alta y permitir el crecimiento exponencial durante un amplio rango de concentraciones celulares, para obtener un rendimiento óptimo con respecto al crecimiento de las bacterias lácticas y a la producción de bacteriocinas (Geis *et al.*, 1983; Parente y Hill, 1992c; Jensen y Hammer 1993; Parente y Ricciardi, 1994; Lejeune *et al.*, 1998). Por lo tanto, los cultivos de *E. faecium* P13 se realizaron en caldo MRS, un medio rico en nutrientes que contiene glucosa como fuente de carbohidratos.

#### IV.4.2.2.4. pH

El pH del medio de cultivo influye en la producción de bacteriocinas, por lo que ésta puede optimizarse mediante el control externo de este parámetro. La elección de las condiciones de incubación adecuadas, especialmente en lo que se refiere al pH, es un factor crucial para la producción de bacteriocinas activas, puesto que pequeños cambios en las condiciones ambientales, que aparentemente no afectan al crecimiento de la bacteria, pueden tener efectos considerables en la producción de estos péptidos (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995).

El crecimiento de bacterias lácticas bacteriocinogénicas en un fermentador bajo condiciones de pH controlado ha permitido la optimización de la producción de un número considerable de bacteriocinas, aunque el pH óptimo para su producción difiere con las cepas productoras y la bacteriocina producida (Tabla II.6, sección II.3). A pesar de estas diferencias, se han observado dos

características comunes a todas ellas: (i) el pH óptimo para la producción de bacteriocinas es inferior al óptimo para el crecimiento (Parente y Ricciardi, 1994; Parente *et al.*, 1994; Casaus, 1998; Krier *et al.*, 1998; Nilsen *et al.*, 1998; Uguen *et al.*, 1998; Leroy y De Vuyst, 1999a; Parente y Ricciardi, 1999) y (ii) la producción óptima tiene lugar en un intervalo de pH ácido comprendido entre 4,7 y 6,2 (Parente y Ricciardi, 1999).

Puesto que existe un efecto marcado del pH en el crecimiento de las bacterias lácticas, la producción de bacteriocinas, en la mayoría de los casos metabolitos primarios o asociados al crecimiento, también estaría influida por este parámetro. No obstante, también debe considerarse el efecto directo del pH en la regulación de la biosíntesis a nivel génico (Olson, 1993). En este contexto, en función del microorganismo y de sus condiciones de crecimiento, modificaciones en el pH exocelular pueden originar cambios en su pH intracelular, en la concentración de los iones  $K^+$  y  $Na^+$  y en uno o ambos componentes de la fuerza protón motriz (Fig.2.8, sección II.5). La alteración de estos parámetros puede influir a su vez sobre una gran variedad de procesos celulares, tales como la síntesis de ATP, el transporte de solutos, el fenómeno de competencia genética, etc., lo que, finalmente, puede desencadenar numerosas señales secundarias (Olson, 1993).

Los mecanismos implicados en la detección de cambios en el pH exocelular podrían basarse en: (i) la existencia de componentes celulares que actúen como sensores directos del pH; (ii) la selectividad de la célula para responder únicamente a un cierto estado de ionización de algunas moléculas, y (iii) la capacidad de ciertos componentes celulares para alterar sus propiedades en respuesta a cambios en los componentes de la fuerza protón motriz. La detección de proteínas con segmentos transmembrana implicadas en la regulación de la expresión génica mediante el pH sugiere que éstas podrían actuar como “sensores” de las modificaciones del pH y transmitir las señales adecuadas a las proteínas que desencadenan la respuesta a nivel de la transcripción y traducción del ADN (Olson, 1993).

#### IV.4.2.3. Crecimiento de *E. faecium* P13 en un fermentador con regulación del pH

El crecimiento de *E. faecium* P13 en un fermentador bajo condiciones de pH controladas puede expresarse con el modelo de Baranyi y Roberts (1994) (ecuación (3), sección IV.2.3), que contiene una función de ajuste del crecimiento,  $\alpha(t)$ , y una función de inhibición del mismo,  $u(x)$ . La función  $\alpha(t)$  describe la fase de latencia, que podría explicarse por la necesidad de alcanzar una concentración determinada de alguna sustancia crítica (por ejemplo, RNA) para inducir el

crecimiento celular. Por otra parte, la función  $u(x)$  considera el crecimiento como un proceso autolimitante en la fase estacionaria debido a las altas concentraciones celulares alcanzadas en dicha fase (Baranyi y Roberts, 1995).

Dado que  $\mu(x)$  disminuye a medida que  $x$  se aproxima a  $x_{\text{máx}}$ , la solución de la ecuación (3) es una función sigmoideal (ver Fig. 4.10) que se aproxima asintóticamente a  $x_{\text{máx}}$  a medida que aumenta  $t$  (Baranyi y Roberts, 1994). La interpretación biológica de dicha función hace referencia a la acción inhibidora de algún metabolito, como el ácido láctico u otros productos del metabolismo no determinados. Alternativamente, ciertos componentes del medio de cultivo (principalmente, compuestos de C y N) que permiten un crecimiento rápido podrían metabolizarse de forma preferencial, lo que resultaría en la deceleración de  $\mu$  a medida que el microorganismo cambia desde condiciones favorables a menos favorables.

#### IV.4.2.4. Producción e inactivación de la enterocina P producida por *E. faecium* P13 en un fermentador con regulación del pH

La producción de enterocina P comenzó a detectarse al principio de la fase logarítmica de crecimiento ( $\text{DO}_{620}=0,2$ ) en todas las fermentaciones de *E. faecium* P13, aunque su aparición fue algo más tardía en los cultivos de pH 6,0 o superior ( $\text{DO}_{620}=0,4$ ); la bacteriocina se produjo de manera continua durante la fase logarítmica de crecimiento y alcanzó el máximo a la mitad (pH 6,2 o superior) o al final (pH 6,0 o inferior y pH no controlado) de dicha fase (Fig. 4.9B sección IV.3.3). Esta cinética, típica de un metabolito primario o asociado al crecimiento, se ha observado en la producción de una serie de bacteriocinas de las bacterias lácticas (De Vuyst y Vandamme, 1992; Kaiser y Montville, 1993; Parente *et al.*, 1994; Parente y Ricciardi, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996; Leroy y De Vuyst, 1999a). No obstante, también existen casos en los que la máxima actividad antimicrobiana se alcanza durante la fase estacionaria del crecimiento (Biswas *et al.*, 1991; Daba *et al.*, 1993; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Paynter *et al.*, 1997; Bárcena *et al.*, 1998), momento en el que los nutrientes comienzan a escasear y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana puede conferir una ventaja en la competición por los sustratos limitantes.

La actividad antimicrobiana máxima (aproximadamente  $2 \times 10^3$  UB/ml) correspondió a los cultivos con el pH controlado a 6,0, lo que significó un incremento de 4 veces con respecto a la actividad antimicrobiana máxima obtenida cuando *E. faecium* P13 creció bajo condiciones de pH no controlado ( $\approx 500$  UB/ml). La actividad antimicrobiana específica máxima se obtuvo en los cultivos

de pH 6,0 y 5,3 ( $0,43 \times 10^3$  UB/ml), seguidos del cultivo control ( $3,32 \times 10^3$  UB/ml) y del cultivo de pH 5,7 ( $2,93 \times 10^3$  UB/ml) (Fig. 4.9C). Dado que para obtener altos rendimientos de bacteriocina se necesita no solo una alta producción específica, sino también una concentración crítica de biomasa (De Vuyst y Vandamme, 1992), se puede concluir que en las condiciones evaluadas el pH para la óptimo para la producción de enterocina P es 6,0.

En los cultivos con el pH ajustado a 4,7; 5,0; 6,2; 7,0 y 8,5, la actividad antimicrobiana específica máxima fue menor que en el cultivo control. Probablemente, la causa que originó esta menor actividad antimicrobiana fue diferente en función del pH del cultivo. Así, en los cultivos de pH 4,7 y 5,0 pudo deberse al crecimiento limitado de *E. faecium* P13, mientras que en los cultivos de pH 6,2; 7,0 y 8,5, que presentaron un crecimiento adecuado y una  $\mu_{\text{máx}}$  elevada, pudo deberse a que bajo condiciones de crecimiento muy favorables prevalece el crecimiento de las células sobre la producción de metabolitos (De Vuyst y Vandamme, 1993).

Una vez alcanzado su valor máximo, la actividad antimicrobiana de los cultivos de *E. faecium* P13 disminuyó de forma más o menos rápida en función del pH. Los cultivos de pH 4,7 y 5,0, junto con el cultivo control, presentaron la mayor estabilidad, mientras que los cultivos de pH superior a 5,3 mostraron un descenso muy rápido de la actividad antimicrobiana, con una estabilidad mínima a pH 8,5 (Fig. 4.9C, sección IV.3.3). El descenso más o menos drástico de la actividad antimicrobiana es un fenómeno que se ha observado en la mayoría de las bacteriocinas. No obstante, existen excepciones, ya que en algunas fermentaciones la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se mantiene relativamente estable durante un tiempo considerable, como es el caso de la lacticina 481 (Piard *et al.*, 1990), acidocina J1132 (Tahara *et al.*, 1996b), acidocina B (ten Brink *et al.*, 1994) y mesentericinas 52A y 52B (Krier *et al.*, 1998), si bien en los dos últimos casos las fermentaciones se llevaron a cabo sin regulación del pH. En este sentido, De Vuyst *et al.* (1996) señalaron que, en general, la tasa de inactivación de las bacteriocinas es mayor en los cultivos con el pH controlado.

La disminución de la actividad antimicrobiana puede deberse a la inestabilidad de la bacteriocina a un pH determinado, a su degradación proteolítica, a su agregación y/o a su adsorción a las células productoras. En cuanto a la primera hipótesis, es decir, la inestabilidad o la menor actividad antimicrobiana de la bacteriocina a determinados valores de pH, puede ser descartada en el caso de la enterocina P, ya que las ligeras diferencias observadas en ambos parámetros (secciones IV.3.5 y IV.3.6) no pueden ser responsables de las diferencias de actividad antimicrobiana obtenidas en los cultivos de *E. faecium* P13 a los diferentes valores de pH.

La inactivación de las bacteriocinas por enzimas proteolíticos, liberados principalmente durante la fase estacionaria de los procesos fermentativos, sería otra causa que explicaría la disminución de la actividad antimicrobiana, ya que la producción y/o la actividad de estos enzimas podrían ser procesos dependientes del pH, con un óptimo a pH alcalino. No obstante, esta hipótesis no pudo demostrarse en los sobrenadantes con actividad antimicrobiana de *E. faecium* P13 (sección IV.3.6), ni se ha demostrado nunca para otras bacteriocinas (Parente y Ricciardi, 1999), a pesar de haber sido evaluada por diversos investigadores (Parente y Ricciardi, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996; Krier *et al.*, 1998; Leroy y De Vuyst, 1999a; Uguen *et al.*, 1999; Mørretrø *et al.*, 2000).

La adsorción de las bacteriocinas a las células productoras es un proceso inespecífico, dependiente del pH y que, probablemente, implica la interacción con los ácidos lipoteicoicos de la pared celular (Bhunia *et al.*, 1991; Leroy y De Vuyst, 1999a). Yang *et al.* (1992) determinaron que a un pH próximo a 6,0 se producía adsorción de la nisina, pediocina PA-1, leuconocina Lcm1 y sakacina A a las respectivas células productoras, mientras que a pH ácido (3 o inferior) no se observaba dicho fenómeno. En el intervalo de pH alcalino, la adsorción variaba desde el 0% a pH 8,0 para la leuconocina Lcm1 hasta el 100% a pH 10 para la sakacina A.

En este trabajo, los procesos de adsorción y desadsorción se realizaron empleando células intactas de *E. faecium* P13 y sobrenadantes con enterocina P, de acuerdo con las técnicas propuestas por Yang *et al.* (1992). No obstante, no se observó adsorción de la enterocina P a las células productoras en el intervalo de pH 4,7 a 8,5, ni tampoco se produjo la desadsorción de la bacteriocina de células obtenidas a partir de un cultivo de pH 8,5 (sección IV.3.4.). A este último valor de pH hubiera sido posible que un gran número de moléculas de enterocina P se hubiesen adsorbido a las células productoras ya que se observó un crecimiento de *E. faecium* P13 cercano al óptimo. Diversos investigadores han demostrado la adsorción de bacteriocinas a las células productoras (Parente y Ricciardi, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996; Uguen *et al.*, 1999), mientras que en otros casos ha sido imposible demostrarla (Mørtvedt-Abildgaard *et al.*, 1995; Krier *et al.*, 1998; Mørretrø *et al.*, 2000). Asimismo, se ha observado la adsorción irreversible de las bacteriocinas a las células productoras, como sucede con la enterocina 1146 (Parente y Ricciardi, 1994). Recientemente, Aymerich *et al.* (2000b) han demostrado que el porcentaje de adsorción de las enterocinas A y B a las células del microorganismo productor *E. faecium* CTC492 permanece constante a pH 3 ó 10; sin embargo, la adición de Tween 80 (1%, v/v) a un cultivo *overnight* de *E. faecium* CTC492 en caldo MRS disminuye considerablemente la adsorción de ambas enterocinas a las células productoras.

Dado que la adsorción es mínima a valores de pH ácidos, resulta sorprendente que en ocasiones este fenómeno se observe en cultivos de bacterias lácticas con el pH no controlado, en los que el pH final es de aproximadamente 4 (De Vuyst *et al.*, 1996). Del mismo modo, resulta paradójico que la actividad antimicrobiana máxima de la enterocina P y de otras bacteriocinas (lactacina B, bavaricina MN, carnobacteriocinas BM2 y B1) se obtenga a pH 6,0, que, como se ha mencionado anteriormente, es el pH óptimo para la adsorción de ciertas bacteriocinas. El fenómeno de adsorción, además de ser uno de los posibles responsables de la disminución de la actividad antimicrobiana, podría causar una disminución de la producción de bacteriocina debido a un mecanismo de inhibición ejercido por el producto final (De Vuyst *et al.*, 1996) o la muerte de las células productoras como consecuencia de una inmunidad limitada a su propia bacteriocina (Callewaert *et al.*, 1999).

Finalmente, la hipótesis de agregación de monómeros activos para producir polímeros con menor actividad antimicrobiana podría explicar la disminución de la actividad antimicrobiana observada en la mayoría de las bacteriocinas durante la fase estacionaria del crecimiento. En este sentido, el empleo de SDS al 0,5% (p/v) incrementó la actividad antimicrobiana de la mesentericina 5 (Daba *et al.*, 1993) y el Triton X-100 (0,002%, v/v) la de la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991), probablemente como consecuencia de la acción disgregante del detergente y la liberación de monómeros más activos.

El hecho de que la actividad antimicrobiana disminuya una vez alcanzado un valor máximo, que depende de la cepa productora y de las condiciones de cultivo, implica que existe un momento en el que la producción cesa y comienza un proceso de degradación o inactivación (De Vuyst y Vandamme, 1992; De Vuyst *et al.*, 1996). Desde un punto de vista ecológico, la disminución de la producción y/o inactivación de las bacteriocinas durante la fase estacionaria estaría compensada por la producción continua de ácido láctico durante esta fase (De Vuyst *et al.*, 1996).

La inestabilidad de la actividad antimicrobiana implica que para lograr un rendimiento óptimo de producción de bacteriocinas es imprescindible obtenerlas inmediatamente después de detectar el máximo de actividad, utilizar condiciones que minimicen la agregación o la adsorción, o bien, retirarlas de manera continua del caldo de fermentación, empleando, por ejemplo, adsorbentes (Parente y Ricciardi, 1994; De Vuyst *et al.*, 1996).



#### IV.4.2.5. Metabolismo de la glucosa en *E. faecium* P13 desarrollado en un fermentador con regulación del pH

En todas las fermentaciones de *E. faecium* P13 realizadas en este trabajo se ha empleado la glucosa como fuente de carbohidratos. La producción de bacteriocinas se ha detectado en medios con diversas fuentes de carbohidratos. Así, por ejemplo, *L. lactis* IO-1 produce nisina Z en medios con glucosa, sacarosa y xilosa, obteniéndose una producción óptima con glucosa (Matsusaki *et al.*, 1996). La glucosa también fue la fuente de carbono más adecuada para la producción de pediocina PA-1 (Biswas *et al.*, 1991). En cambio, la producción de plantaricina C por *Lb. plantarum* LL441 y de enterocina 1146 por *E. faecium* DPC1146 fue mayor en presencia de sacarosa que de glucosa (Bárcena *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999) y la de las enterocinas A y B se incrementó considerablemente en presencia de una combinación de glucosa y sacarosa (Aymerich *et al.*, 2000b).

Dado que *E. faecium* P13 es una bacteria homofermentativa, el consumo de glucosa durante el proceso fermentativo se calculó directamente a partir del consumo de base (NaOH 12N) necesaria para neutralizar el ácido láctico producido como consecuencia del metabolismo de la glucosa. En general, el ácido láctico representa más del 90% de los productos del metabolismo de la glucosa en las bacterias lácticas homofermentativas (ten Brink y Konings, 1982; Bárcena *et al.*, 1998; Lejeune *et al.*, 1998; Leroy y De Vuyst, 1999a), es decir, la glucosa se convierte cuantitativamente en ácido láctico y no se utiliza para la construcción de material celular, sino para generar y mantener un flujo de energía bioquímica.

El isómero L del ácido láctico es un metabolito de gran relevancia biológica. Por una parte, como se ha señalado anteriormente, ejerce un efecto antimicrobiano especialmente importante durante la fase estacionaria del crecimiento, en la que los niveles de bacteriocina han empezado a disminuir. Por otra parte, su excreción al medio exocelular en simporte con iones  $H^+$  contribuye significativamente a la generación de energía, especialmente en las bacterias estrictamente fermentativas que poseen únicamente el complejo ATPasa para extruir protones (ten Brink y Konings, 1982). En estas bacterias, la translocación de iones  $H^+$  acoplada al ácido láctico puede representar una producción adicional de energía de hasta el 50%, lo que se traduce en un aumento del rendimiento celular. Mientras que la tasa de producción de lactato de *L. cremoris* no depende del pH externo, la estequiometría del transporte lactato- $H^+$  depende de la concentración de lactato y del pH del medio exocelular, de manera que, a pH inferior a 6,0 no se produce energía suplementaria por la translocación de  $H^+$  acoplada al lactato (ten Brink y Konings, 1982; ten Brink

*et al.*, 1985). Este hecho podría contribuir al mayor rendimiento celular obtenido cuando *E. faecium* P13 creció a valores de pH 6,0 y superiores.

El ácido láctico puede, además, inhibir a sus propias células productoras. Así por ejemplo, cuando *L. cremoris* creció sin regulación de pH, el cese del crecimiento ocurrió concomitantemente a la acidificación del medio desde pH 6,3 a 4,5, a pesar de que no se había consumido toda la lactosa disponible. Sin embargo, cuando los cultivos se desarrollaron a pH constante 6,3, la biomasa final se triplicó. No obstante, cuando se evaluó la inhibición del crecimiento de *L. cremoris* se observó que el ácido láctico, y, más concretamente, su forma disociada, no era su principal causa (Bibal *et al.*, 1988). De manera similar, De Vuyst y Vandamme (1992) señalaron que la acumulación de ácido láctico en cultivos de *L. lactis* sin regulación del pH impedía alcanzar una biomasa y una producción de nisina elevadas cuando se había consumido aproximadamente el 60% de la glucosa del medio. Al igual que en el caso anterior, la producción de biomasa y bacteriocina aumentaron cuando se neutralizó el ácido láctico producido durante la fermentación.

La inhibición ejercida por el ácido láctico y otros productos finales del metabolismo de *L. lactis* fue evaluada por Loubiere *et al.* (1997). La adición de lactato sódico al medio de cultivo antes de su inoculación provocó la disminución de su tasa de crecimiento. Dado que la adición de NaCl en lugar de lactato sódico tuvo el mismo efecto en el crecimiento, el efecto tóxico de ambas sales podría estar mediado simplemente por el establecimiento de una presión osmótica. Tras examinar el efecto de otros productos del metabolismo producidos en menor cantidad, tales como el formato, acetato y etanol, los autores concluyeron que el ácido láctico es el producto menos inhibidor del crecimiento de *L. lactis*, siendo responsable únicamente de un 5% de la inhibición; por lo tanto, el efecto antagonista del crecimiento podría deberse a otros metabolitos no identificados, al peróxido de hidrógeno o incluso a las bacteriocinas (Loubiere *et al.*, 1997).

Las limitaciones nutricionales también juegan un papel crucial en la inhibición del crecimiento y la producción de bacteriocinas. A este respecto, el consumo de glucosa una vez que ha cesado el crecimiento indica que otros nutrientes pueden ser los responsables del fenómeno de inhibición. Dado que en las bacterias lácticas la síntesis de material celular tiene lugar íntegramente a partir del carbono de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo, el rápido consumo de estos principios inmediatos puede justificar, al menos parcialmente, la inhibición del crecimiento (Loubiere *et al.*, 1997). Así, por ejemplo, la suplementación del medio MRS con glucosa (fuente de energía), aminoácidos (bloques estructurales) y vitaminas (factores imprescindibles para el crecimiento) permitió incrementar la biomasa de *Lb. amylovorus* DCE471 y la producción de amilovorina L471 (De Vuyst *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1998).

En todas las fermentaciones de *E. faecium* P13 realizadas en este trabajo se empleó una concentración inicial de glucosa de 20 g/l. Con el objeto de impedir que este carbohidrato pudiera ser el factor limitante para el crecimiento y/o la producción de enterocina P se añadió glucosa a los cultivos antes de que la presente inicialmente en el medio se hubiera consumido totalmente. La influencia de la concentración inicial de carbohidratos se ha evaluado en la producción de nisina por *L. lactis* NIZO 22186 (De Vuyst y Vandamme, 1992) y de amilovorina L471 por *Lb. amylovorus* DCE 471 (De Vuyst *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1998). En el caso de la nisina, la actividad antimicrobiana específica fue máxima con 10 g/l de sacarosa, pero la biomasa y la producción neta de bacteriocina aumentaron con una concentración inicial de 20 g/l de sacarosa. El empleo de concentraciones comprendidas entre 20-40 g/l de sacarosa produjo un incremento de la biomasa no acompañado de un incremento en la producción de la bacteriocina y concentraciones superiores a 40 g/l redujeron ambos parámetros. En lo que respecta a la amilovorina L471, se comprobó que su producción final era similar para concentraciones de glucosa de 20, 30, 40 y 60 g/l. Aunque la producción específica aumentó con la concentración de glucosa y fue máxima a 60 g/l (posiblemente porque una concentración tan elevada constituye una condición osmótica estresante), ésta cesó antes cuanto mayor fue la concentración inicial de glucosa del medio. Estos resultados sugieren que la producción máxima de bacteriocina está determinada por un factor limitante del medio de cultivo distinto de la glucosa, por una regulación ejercida por los catabolitos del carbono o por el producto final, o bien por una inmunidad limitada del productor (Lejeune *et al.*, 1998).

Como conclusión de lo expuesto anteriormente, el límite en la producción de bacteriocinas podría estar determinado por una combinación de factores metabólicos y nutricionales que incluirían la ligera inhibición ejercida por el ácido láctico y ciertos productos traza del metabolismo no identificados, el agotamiento de nutrientes esenciales del medio de cultivo, tales como aminoácidos o vitaminas, la regulación ejercida por la fuente de carbohidratos o el producto final, y la inmunidad limitada del productor a su propia bacteriocina. En este sentido, Kim *et al.* (1997) demostraron que el límite de la producción de nisina está determinado tanto por la disponibilidad de nutrientes como por la inhibición causada por la propia bacteriocina.

#### IV.4.3. EFECTO DE SOBRENADANTES ACTIVOS DE *E. faecium* P13 EN SU CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ENTEROCINA P EN CALDO BHI

Casaus (1998) determinó el efecto de la composición del medio de cultivo en el crecimiento de *E. faecium* P13 y en la producción de enterocina P, y a pesar de que la biomasa formada y la tasa de crecimiento fueron similares a la de los cultivos desarrollados en el medio MRS, no detectó actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de los cultivos en el medio BHI; además, el pH final de los cultivos en el caldo BHI (5,5) fue superior al obtenido en el caldo MRS (4,3). Otros autores han obtenido resultados similares con respecto a la producción de diversas bacteriocinas en caldo BHI (Rodríguez, 1991; Sobrino, 1993; Moreira, 1993).

Entre las hipótesis para explicar la ausencia de actividad en el caldo BHI pueden considerarse la influencia negativa del pH inicial del caldo BHI (7,4) en el crecimiento de *E. faecium* P13, y/o del pH final del cultivo (5,5), que interferiría en la secreción de la bacteriocina y/o causaría su adsorción a las células productoras. En este trabajo se ha demostrado que el pH inicial 7,4 se encuentra muy próximo al pH que proporciona la máxima  $\mu_{\text{máx}}$  (pH 7,2), y que sí se detecta actividad antimicrobiana a pH 5,5, por lo que ambas hipótesis pueden descartarse.

La presencia de inhibidores en el caldo BHI que impidan la producción de la bacteriocina es poco probable, ya que cuando el caldo se suplementa con sobrenadantes con actividad antimicrobiana procedentes de un cultivo de *E. faecium* P13 en caldo MRS, se observa que la actividad antimicrobiana aumenta con concentraciones crecientes de sobrenadante (sección IV.3.7).

Casaus (1998) también señaló como causa de la ausencia de detección de enterocina P en el caldo BHI la posibilidad de que este caldo careciera de la cantidad mínima de alguna sustancia imprescindible para la síntesis y/o secreción de enterocina P activa. En este sentido, podrían ser determinantes la menor concentración de glucosa del caldo BHI y la ausencia de los cationes divalentes  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  y/o del agente tensioactivo Tween 80. Dado que los sobrenadantes añadidos son “medios gastados”, es decir, probablemente contienen poca glucosa remanente, es poco factible que este carbohidrato sea la causa principal del aumento del crecimiento y de la producción de actividad antimicrobiana en los cultivos con el 5% de sobrenadante o MRS (Fig. 4.14, sección IV.3.7).

Actualmente, se conocen varias bacteriocinas cuya producción está bajo el control de mecanismos de regulación basados en la interacción de un factor de inducción con el sistema de transducción de señales de dos componentes (Diep, 1996; Eijssink *et al.*, 1996; Saucier *et al.*, 1997; Nilsen *et al.*, 1998). Puesto que se ha demostrado que determinadas señales extracelulares, como la

concentración de glucosa o el pH del medio, pueden afectar al sistema de transducción de señales (Regassa y Betley, 1992), la escasa producción de bacteriocina obtenida en ciertos medios de cultivo, en los que se produce un crecimiento adecuado del microorganismo productor, podría estar relacionada con la respuesta del sistema de regulación a las condiciones nutricionales y ambientales del medio. En este contexto, para comprobar si la baja producción de enterocina P observada en BHI se debía a la alteración de la biosíntesis, secreción, estabilidad y/o interacción con el sistema de transducción de señales de un hipotético IF, los cultivos de *E. faecium* P13 se suplementaron con sobrenadantes de *E. faecium* P13 con actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana total fue máxima en los cultivos suplementados con un 5% de MRS. En lo que se refiere a la actividad antimicrobiana específica, ésta fue máxima en el cultivo control y en el que se adicionó un 5% de sobrenadante, mientras que la estabilidad de la actividad antimicrobiana fue superior en los cultivos con un 5% de sobrenadante y MRS. Puesto que la actividad antimicrobiana específica del cultivo control fue similar a la del que contenía un 5% de sobrenadante, el principal efecto del sobrenadante en la actividad antimicrobiana total podría consistir en la estabilización de dicha actividad, probablemente como consecuencia de su contenido en Tween 80 como agente antiagregante. En este sentido, el efecto beneficioso del Tween 80 en la producción de bacteriocinas, en la prevención de la pérdida de su actividad antimicrobiana o en la disociación de agregados inactivos se ha observado por numerosos investigadores (Biswas *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 1992; Nissen-Meyer *et al.*, 1992a; Daba *et al.*, 1993; Aymerich *et al.*, 2000b).

En cualquier caso, permanece por resolver el motivo por el que la producción de enterocina P en el caldo BHI, incluso en el suplementado con un 5% de sobrenadante, representa aproximadamente un 25% de la obtenida en caldo MRS bajo condiciones de pH no controlado, a pesar de que el crecimiento es similar en ambos medios.



## *CAPÍTULO V*

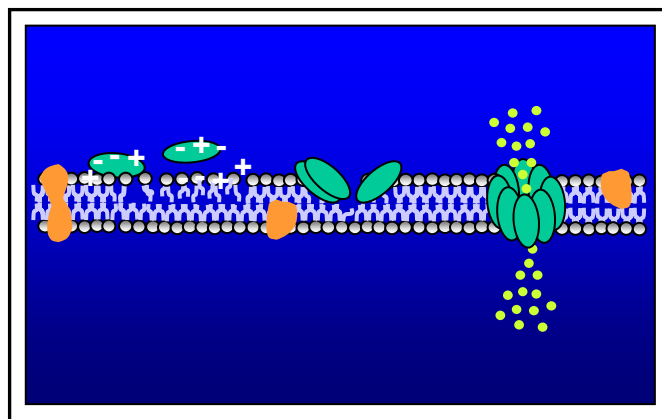
### *MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P*





## V.1. INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas pueden englobarse dentro de un grupo amplio de compuestos antimicrobianos que incluye péptidos de origen bacteriano (lantibióticos y no lantibióticos) y de origen eucariótico, como las cecropinas, las magaininas, la melitina y la alameticina (Hancock y Chapple, 1999; Nissen Meyer y



Nes, 1997). A pesar de su diversa procedencia, los péptidos antimicrobianos tienen en común su pequeño tamaño molecular (3-6 kDa), su elevado punto isoeléctrico (pI) y su capacidad para formar estructuras anfipáticas que les permiten interaccionar con las membranas biológicas (Venema *et al.*, 1993; Montville *et al.*, 1995 ).

La enterocina P es un péptido antimicrobiano de pequeño tamaño molecular (4.630 Da), anfipático y catiónico (pI $\approx$  8,1), por lo que su actividad antibacteriana podría estar mediada por la permeabilización de la membrana de las células sensibles, al igual que se ha demostrado con otras bacteriocinas de las bacterias lácticas (van Belkum *et al.*, 1991b; Venema *et al.*, 1993; Abee *et al.*, 1994; González *et al.*, 1996; Marciset *et al.*, 1997; Moll *et al.*, 1996). Con el objeto de investigar el mecanismo de acción de la enterocina P en *E. faecium* T136, se determinó el efecto de la bacteriocina en los componentes de la PMF (el potencial de membrana,  $\Delta\Psi$ , y el gradiente de pH,  $\Delta\text{pH}$ ) (Fig. 2.8, sección II.5.1.3), la concentración de ATP intracelular, la inhibición del transporte y la liberación de sustratos preacumulados en las células sensibles. Asimismo, se evaluó el efecto de la bacteriocina en liposomas derivados de los lípidos totales de *E. faecium* T136 y en liposomas sintéticos preparados con lípidos de *E. coli*.

En los últimos años existe una preocupación creciente por el desarrollo de resistencias microbianas frente a los antibióticos empleados con mayor frecuencia en el tratamiento de infecciones (Davies, 1996) y por el peligro que constituye la presencia de microorganismos patógenos, especialmente *L. monocytogenes*, en los alimentos (Janda y Abbott, 1999; Muriana, 1996). Una de las estrategias propuestas para minimizar ambos problemas consiste en el empleo de péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal (Hancock, 1997; Nissen-Meyer y Nes, 1997); en

este contexto, la optimización de su aplicación, así como el diseño de nuevos péptidos con una mayor eficacia *in vivo*, requiere el conocimiento del mecanismo molecular que determina su actividad y especificidad antimicrobianas.

## V.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos descritos en este capítulo se realizaron empleando enterocina P purificada a homogeneidad (sección III.2.7). *E. faecium* T136 se empleó como microorganismo indicador en los ensayos de actividad antimicrobiana en placas microtituladoras (sección III.2.4.4) y en los experimentos realizados para determinar el efecto de la enterocina P en la viabilidad celular y su mecanismo de acción molecular.

Como trabajo preliminar a la realización de los experimentos descritos en este capítulo se determinaron el peso celular seco (PCS) y la concentración de proteína total de las células de *E. faecium* T136. El PCS de las células se determinó a partir de 1 ml de cultivos con  $DO_{620} = 0,6$ ; para ello, tras la centrifugación de los cultivos, las células se resuspendieron en 1 ml de solución salina (0,9% NaCl, p/v) estéril y se dispensaron (por cuadruplicado) en bandejas de aluminio desechables previamente pesadas. También se dispuso 1 ml de solución salina estéril en tres platillos adicionales. Los platillos se desecaron en un horno a 100°C durante toda la noche, y al día siguiente se determinó su incremento de peso en presencia y en ausencia de células en una balanza de precisión. La media del incremento de peso de los platillos sin células se sustrajo del incremento medio de peso de los platillos con células, obteniéndose el peso celular seco de *E. faecium* T136. Por otra parte, la concentración de proteína total de las células de *E. faecium* T136 ( $DO_{620} = 1$ ) se determinó mediante un ensayo colorimétrico empleando un *kit* comercial (DC Protein Assay, Bio Rad, Hercules, EE.UU) y seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar para construir la curva de calibración.

### V.2.1. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LA VIABILIDAD DE CULTIVOS DE *E. faecium* T136

Con el objeto de establecer si la enterocina P ejerce un efecto bacteriostático o bactericida en *E. faecium* T136, se determinó el efecto de la bacteriocina purificada en el crecimiento de dicho microorganismo. Para ello, el microorganismo indicador se inoculó en caldo MRS y se incubó a 32°C durante 16 h. A partir de este cultivo se inocularon aproximadamente  $10^5$  ufc/ml en 4,5 ml de caldo MRS y se añadieron 500 µl de una muestra de enterocina P pura con una actividad antimicrobiana de  $2,5 \times 10^4$  UB/ml. Como control se empleó el mismo volumen del caldo MRS al que se le adicionaron 500 µl del solvente en el que estaba disuelta la bacteriocina (70% agua desionizada (0,1% TFA), 30% isopropanol (0,1% TFA)). Los tubos problema y control se incubaron a 32°C durante 24 h, realizándose a intervalos variables recuentos de las unidades formadoras de colonias.

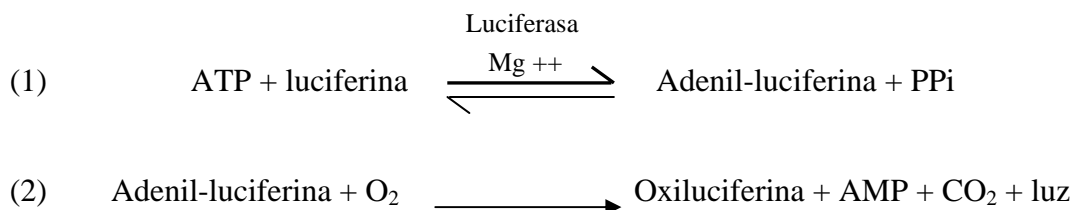
Para determinar si las células supervivientes al tratamiento (36 h) con  $5 \times 10^3$  UB/ml de enterocina P eran resistentes a esta bacteriocina o se desarrollaban como consecuencia de su agotamiento, estas células se cultivaron nuevamente en presencia de  $2,5 \times 10^3$  UB/ml de enterocina P, determinándose a intervalos variables la DO<sub>620</sub> de los cultivos en un colorímetro.

Finalmente, para establecer si la enterocina P ejerce una acción bacteriolítica en las células sensibles, se trataron  $10^8$  ufc/ml con  $1 \times 10^4$  UB/ml de enterocina P, determinándose asimismo a intervalos variables la DO<sub>620</sub> de los cultivos en un colorímetro.

El modo de acción de la enterocina P se consideraría bactericida si se observase una disminución de las ufc/ml con respecto al recuento inicial y bacteriostático si los recuentos se mantuviesen constantes durante la incubación. Por otra parte, si la acción bactericida fuera bacteriolítica, se observaría una disminución de la DO<sub>620</sub> con respecto a la del control.

#### **V.2.2. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS NIVELES INTRA- Y EXTRACELULARES DE ATP**

El efecto de la enterocina P en las concentraciones intra y extracelulares de ATP de *E. faecium* T136 se determinó empleando una modificación del método descrito por Chen y Montville (1995). Las células de un cultivo de *E. faecium* T136 desarrollado en 10 ml de caldo MRS a 30°C (DO<sub>620</sub> =0,6) se recogieron por centrifugación a 8.000 rpm y 4°C durante 10 min, se lavaron con tampón 2-(N-morfolino)-etanosulfonato (MES) 50 mM (pH 6,5) y se mantuvieron en hielo hasta su empleo. Antes de determinar los niveles de ATP intra y extracelulares, las células se resuspendieron a la mitad de su volumen original en tampón MES 50mM (pH 6,5) con un 0,2% de glucosa (p/v) y se incubaron durante 20 min con objeto de incrementar su concentración de ATP (proceso de “energización”). A continuación, la suspensión celular se trató con 5, 20, 50 y 100 UB/ml de enterocina P, y, seguidamente, se determinaron las concentraciones de ATP total e intracelular de *E. faecium* T136 durante 20 min, empleando como control células de *E. faecium* T136 sin tratar con la bacteriocina. Asimismo, células de *E. faecium* T136, que no habían sido energizadas previamente, se trataron con 50 UB/ml de enterocina P durante 20 min, determinándose posteriormente su producción de ATP tras la adición de glucosa. La determinación de la concentración de ATP se realizó mediante un ensayo de detección de la bioluminiscencia empleando un *kit* comercial (Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.). El ensayo se basa en la detección de la luminiscencia emitida cuando la enzima luciferasa consume ATP para oxidar la D-luciferina de acuerdo con las siguientes reacciones:



La reacción (1) es reversible y su equilibrio está desplazado hacia la derecha; en cambio, la reacción (2) es irreversible. Si el ATP es el reactivo limitante, la emisión de luz es proporcional a la presencia de ATP.

Para determinar el ATP total, se trataron 20  $\mu\text{l}$  de las suspensiones celulares con las diferentes concentraciones de enterocina P con 80  $\mu\text{l}$  del detergente dimetilsulfóxido (DMSO) y, tras su incubación durante 30 s a temperatura ambiente, se diluyeron en agua desionizada estéril hasta un volumen final de 5 ml. Por otra parte, para determinar el ATP extracelular, 100  $\mu\text{l}$  de las suspensiones celulares tratadas con enterocina P se diluyeron en 4,9 ml de tampón MES 50mM (pH 6,5). Finalmente, 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones anteriores se mezclaron con 100  $\mu\text{l}$  del *ATP Assay Mix* (con luciferina, luciferasa,  $\text{MgSO}_4$ , DTT, EDTA, BSA y un tampón de tricina) del *kit* comercial y se determinó su bioluminiscencia en un luminómetro mod. Lumac Biocounter M2010A (3M, Ontario, Canadá). En los ensayos de determinación de la concentración de ATP se realizó una curva patrón determinando la bioluminiscencia de soluciones con una concentración de ATP conocida, lo que permitió transformar la bioluminiscencia de las muestras (expresada en unidades de intensidad luminosa relativa, ILR) en concentración de ATP (expresada en nmoles/ml). Finalmente, la concentración de ATP se expresó en nmoles/mg de peso celular seco.

### V.2.3. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL TRANSPORTE DE SUSTRATOS RADIATIVOS EN CÉLULAS DE *E. faecium* T136

El efecto de la enterocina P en ciertos procesos de transporte de iones y metabolitos de *E. faecium* T136 se determinó empleando los sustratos radiactivos  $\text{Rb}^{86}$  (0,15 mCi/mmol),  $\text{P}_i^{33}$  (3.000 Ci/mmol) y  $[\text{C}^{14}]$ -ácido glutámico (260 mCi/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). Para ello, se obtuvieron células de un cultivo de *E. faecium* T136 en la fase logarítmica del crecimiento ( $\text{DO}_{620} = 0,8$ ) y se lavaron (5.000 rpm durante 1 min) cuatro veces con tampón fosfato sódico (NaP) 50 mM (pH 7,0), NaMES 50 mM (pH 7,0) o fosfato potásico (KP) 50 mM (pH 7,0), en los experimentos de transporte de  $\text{Rb}^{86}$ ,  $\text{P}_i^{33}$ -fosfato, y  $[\text{C}^{14}]$ -ácido glutámico, respectivamente. A continuación, las células se resuspendieron en los tampones correspondientes a una concentración

final de 137,5 µg proteína celular/ml. Las operaciones descritas a continuación se realizaron en un laboratorio de radioisótopos dotado de las medidas de seguridad adecuadas:

- 1) A las células de *E. faecium* T136, resuspendidas en 1,2 ml del tampón adecuado a una concentración final de 137,5 µg/ml e incubadas en un baño de agua termostatado a 30°C, se les añadieron 12 µl de los sustratos radiactivos Rb<sup>86</sup> (1/10), [C<sup>14</sup>]-ácido glutámico (1/1) ó Pi<sup>33</sup>-fosfato (1/100). En los experimentos con Rb<sup>86</sup> se emplearon, además de las células sensibles de *E. faecium* T136, células de *E. faecium* P13 y células viables obtenidas a partir de un cultivo de *E. faecium* T136 sometido a un tratamiento con  $1 \times 10^4$  UB/ml de enterocina P durante 24 h. Estas células se denominaron *E. faecium* T136r (“resistentes”), ya que no resultaron inhibidas por el sobrenadante de un cultivo de *E. faecium* P13 capaces de inhibir las células de *E. faecium* T136.
- 2) Seguidamente, de cada una de las muestras se tomaron 100 µl que se depositaron inmediatamente en un filtro de nitrato de celulosa de 0,45 µm de espesor acoplado a un matraz conectado a un sistema de vacío. El filtro se lavó con 2 ml de tampón LiCl 0,1 M frío y se introdujo en un tubo de Eppendorf para determinar posteriormente la radiactividad de las células retenidas en el filtro.
- 3) A continuación, se le añadió glucosa (0,5 %, p/v) a la suspensión celular y se tomaron muestras cada 5 min, que se procesaron de la manera descrita en el apartado anterior.
- 4) Transcurridos 20 min desde la adición de la glucosa, se añadió la enterocina P (60 y 120 UB/ml) o el solvente en el que ésta estaba disuelta [60% isopropanol (v/v) con 0.1% TFA (v/v)] a la suspensión celular y se tomaron muestras cada 5 min, que se procesaron como se ha descrito en el apartado 2.
- 5) El experimento concluyó con la adición de nisina (10 µM) para lisar las células y la extracción de una última muestra a los 5 min de su adición, que se procesó como se ha descrito en el apartado 2.

Finalmente, se añadieron 1,2 ml de líquido de centelleo (Emulsifier Scintillator Plus, Packard) a los tubos de Eppendorf con los filtros y se determinó su radiactividad en un contador de centelleo líquido mod. Tri-Carb 460 CD (Packard Instruments Corp.).

#### V.2.4. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS COMPONENTES DE LA FUERZA PROTÓN MOTRIZ (PMF)

El efecto de la enterocina P en los componentes de la PMF,  $\Delta\text{pH}$  y  $\Delta\Psi$ , se determinó de forma indirecta mediante el empleo de sondas fluorescentes. La fluorescencia de las sondas se midió en un espectrofluorímetro mod. LS50B (Perkin Elmer), termostatado a 30°C y con agitación magnética continua. Con objeto de evitar la adhesión de los ionóforos valinomicina y nigericina a las paredes de la cubeta de cuarzo, ésta se lavó abundantemente con agua desionizada y etanol 96° entre experimentos.

##### V.2.4.1. Efecto de la enterocina P en el gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) de células de *E. faecium* T136

El efecto de la enterocina P en el  $\Delta\text{pH}$  (alcalino en el interior) de células de *E. faecium* T136 se determinó empleando la sonda fluorescente 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5(y 6)-carboxifluoresceína (BCECF) (Molecular Probes, Leiden, Holanda), tal como describieron Molenaar *et al.* (1991). El BCECF es un compuesto fluorescente derivado de la fluoresceína que se emplea frecuentemente como indicador del pH intracelular, ya que su  $\text{pK}_a$  (7,0) se encuentra en el rango de valores del pH citoplasmático (6,8-7,4). Dado que la absorción del anión fenolato (forma básica del BCECF) es mayor a la de la forma protonada (forma ácida del BCECF), la disminución de la fluorescencia es una medida indirecta de la disipación del gradiente de pH.

El procedimiento seguido para la obtención de las células de *E. faecium* T136 y la inclusión intracelular de la sonda BCECF fue el siguiente:

- 1) Las células de un cultivo de *E. faecium* T136 en caldo MRS a 32°C ( $\text{DO}_{620} \simeq 0,8$ ) se lavaron cuatro veces con tampón KP 50 mM (pH 7,0) a 5.000 rpm durante 1 min y se resuspendieron (por duplicado) en un volumen reducido del tampón (2-20  $\mu\text{l}$ ) a una concentración final de 25 mg proteína celular/ml.
- 2) A continuación, se añadieron BCECF 1 mM y HCl 0,5 M (2  $\mu\text{l}$  en un tubo y 2,5  $\mu\text{l}$  en otro) a la suspensión celular, se agitó suavemente y se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 min.

- 3) Una vez transcurrida la incubación, las células se lavaron cuatro veces con tampón KP 50 mM (pH 7,0) para eliminar el BCECF no incluido en su interior y para neutralizar el efecto tóxico del ácido.
- 4) Finalmente, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de tampón KP 50 mM (pH 7,0) y se seleccionaron aquéllas que mostraron el color amarillo más intenso tras el tratamiento ácido más moderado.

Para determinar el efecto de la enterocina P en el  $\Delta$ pH de células de *E. faecium* T136 cargadas con BCECF se depositó la suspensión celular (14  $\mu$ g proteína celular/ml) en una cubeta de cuarzo con 1,8 ml de tampón KP 50 mM (pH 6,5) y, una vez estabilizada la señal fluorescente, se adicionaron la enterocina P (10 y 50 UB/ml) o el solvente (sección V.2.3, apartado 4), y el ionóforo nigericina (0,25  $\mu$ M). La fluorescencia de las células se cuantificó en el espectrofluorímetro empleando longitudes de onda de 502 y 525 nm para la excitación y la emisión, respectivamente.

#### **V.2.4.2. Efecto de la enterocina P en el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de células de *E. faecium* T136**

El efecto de la enterocina P en el  $\Delta\Psi$  de células de *E. faecium* T136 se determinó cualitativamente mediante el empleo de la sonda fluorescente yoduro de 3,3'-dipropil-tiodicarbocianina [DiSC<sub>3</sub>(5)] suministrada por Molecular Probes. El DiSC<sub>3</sub>(5) es una sonda que se acumula en membranas hiperpolarizadas y se integra en el interior de la bicapa lipídica; su agregación dentro de la membrana resulta en una disminución de la fluorescencia (extinción), mientras que la despolarización de la membrana causa la liberación de la sonda y, por tanto, la recuperación de su fluorescencia (Sims *et al.*, 1974).

Las células de *E. faecium* T136 se obtuvieron como se ha descrito en el apartado 1 de la sección anterior, con la única excepción de que su concentración final fue de 2,5 mg de proteína celular/ml.

Para determinar el efecto de la enterocina P en el  $\Delta\Psi$  de células de *E. faecium* T136 se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero, la suspensión celular de *E. faecium* T136 (13,75  $\mu$ g proteína celular/ml) se depositó en una cubeta de cuarzo con 1,8 ml del tampón K-HEPES 50 mM y, tras la adición de la sonda DiSC<sub>3</sub>(5) (0,25  $\mu$ M), se generó un  $\Delta\Psi$  mediante la adición de glucosa (0,5%) y el ionóforo nigericina (intercambiador H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>). En esta aproximación se emplearon además células de *E. faecium* P13 y de *E. faecium* T136r (sección V.2.3). En el segundo



experimento, el  $\Delta\Psi$  se generó mediante la adición del ionóforo de  $K^+$  valinomicina (cataliza el uniporte de  $K^+$ ) a células no energizadas de *E. faecium* T136 (13,75  $\mu\text{g}$  proteína celular/ml), resuspendidas en 1,8 ml de tampones sin  $K^+$  (NaP 50 mM, CsCl 50 mM y cloruro de colina, con el pH ajustado a 7,0). Finalmente, se adicionó la enterocina P (30 y 70 UB/ml) o el solvente, y nisina (6  $\mu\text{M}$ ). La fluorescencia de las células se cuantificó en el espectrofluorímetro empleando longitudes de onda de 643 y 666 nm para la excitación y la emisión, respectivamente.

#### V.2.5. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL MOVIMIENTO TRANSMEMBRANA DE IONES $K^+$

El efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de iones  $K^+$  se determinó con la sonda fluorescente ácido 3-bencenodicarboxílico, 4, 4'- [1, 4, 10, 13-tetraoxa-7, 16-diazociclo-octadecano-7, 16-diilobis (5-metoxi-6, 2-benzofurandilo)] bis- (PBFI, del inglés *Potassium-Binding Benzofuran Isophthalate*) (Jezek *et al.*, 1990) suministrada por Molecular Probes. El fluoróforo contiene una corona de éter con una cavidad cuyo tamaño le confiere la especificidad para el  $K^+$ . La concentración del catión se determinó de forma indirecta por el aumento de fluorescencia causado por su unión a la sonda.

Las células de *E. faecium* T136 se obtuvieron como se ha descrito en el apartado 1 de la sección V.2.4.1, con la excepción de que se resuspendieron en tampón cloruro de colina 50 mM (con el pH ajustado a 7,0 con 20 mM bis-tris propano) a una concentración final de 5 mg/ml.

Para determinar el efecto de la enterocina P en el  $\Delta\Psi$  de células de *E. faecium* T136, la suspensión celular (275  $\mu\text{g}$  proteína celular/ml) se depositó en una cubeta de cuarzo con 1,8 ml del tampón cloruro de colina 50 mM (pH 7,0) y la sonda PBFI (8  $\mu\text{M}$ ). A continuación, se añadió glucosa a las células (0,5%, p/v) y, una vez estabilizada la fluorescencia de la sonda, se añadió enterocina P (60 UB/ml) o solvente. Finalmente, el ionóforo valinomicina (0,25  $\mu\text{M}$ ) se empleó para equilibrar la concentración de  $K^+$  a ambos lados de la membrana. La fluorescencia de las células se midió en el espectrofluorímetro empleando longitudes de onda de 336 y 507 nm para la excitación y la emisión, respectivamente.

## V.2.6. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LIPOSOMAS

El efecto de la enterocina P en un sistema de lípidos modelo se determinó empleando liposomas derivados de los lípidos totales de *E. faecium* T136 y liposomas sintéticos compuestos por dioleil-glicero-fosfatidilcolina (DOPC) y dioleil-glicero-fosfatidilglicerol (DOPG) (1:1).

### V.2.6.1. Efecto de la enterocina P en liposomas de *E. faecium* T136 cargados de carboxifluoresceína

#### V.2.6.1.1. Aislamiento de los lípidos totales de *E. faecium* T136

Las células de 1 l de cultivo de *E. faecium* T136 en caldo MRS a 32°C ( $DO_{620} = 0,8$ ) se obtuvieron por centrifugación a 8.000 rpm y 4°C durante 15 min y se lavaron en 500 ml de agua de peptona (0,1%, p/v). El aislamiento de los lípidos totales se realizó empleando una modificación (Winkowski *et al.*, 1996) del método de Bligh y Dyer (New, 1992), como se detalla a continuación:

- 1) Se pesaron 6 g de esferas de vidrio (100-150  $\mu$ m de diámetro, Sigma) por duplicado y se añadieron a dos tubos de centrífuga de propileno (50 ml).
- 2) Las células lavadas con el agua de peptona se resuspendieron en 4 ml de HCl 0,1N y se transfirieron a los tubos de centrífuga con las esferas de vidrio, a los que se añadieron 10 ml de metanol.
- 3) A continuación, se añadieron 5 ml de cloroformo a la suspensión celular y ésta se agitó enérgicamente. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, agitándose durante este período vigorosamente cada 20 min.
- 4) Transcurrida la incubación, se añadieron a la mezcla 5 ml adicionales de cloroformo y 6 ml de HCl 0,1N (*ratio* final metanol:cloroformo:HCl = 1:1:1) y se agitó de nuevo.
- 5) Seguidamente, se centrifugó la suspensión celular a  $1000 \times g$  a temperatura ambiente durante 3 min. Tras la centrifugación se obtuvieron tres fases: (i) una fase superior con metanol y HCl que se desechó; (ii) una fase intermedia con el cloroformo y los lípidos (separada de la fase superior por una interfase con células), que se trasvasó a un tubo de vidrio pesado previamente; y (iii) un sedimento con las esferas de vidrio.
- 6) El pH de los lípidos extraídos en cloroformo se neutralizó a pH 7,0 con una solución de  $NH_4OH$  1N en metanol.

- 7) A continuación, los lípidos se desecaron en un baño de agua a 25°C bajo una corriente de gas N<sub>2</sub> y se determinó su peso seco.
- 8) Finalmente, los lípidos se resuspendieron en 3 ml de cloroformo:metanol (9:1) y se dividieron en tres viales de cristal oscuro que se sellaron y mantuvieron a –20°C hasta su empleo.

#### **V.2.6.1.2. Preparación de liposomas cargados de carboxifluoresceína mediante cromatografía de filtración en geles**

Para la preparación de liposomas unilamelares de gran tamaño cargados de 5 (6)-carboxifluoresceína (CF) se siguió el procedimiento descrito por Hromy y Carman (1986), con las modificaciones introducidas por Winkowski *et al.* (1996). Dicho procedimiento se basa en la puesta en contacto de los fosfolípidos y la fase acuosa por la acción de detergentes que protegen del agua a las porciones hidrofóbicas de las moléculas lipídicas. La eliminación lenta del detergente, en este caso mediante una cromatografía de filtración en gel, permite la formación espontánea de liposomas unilamelares (New, 1992). El protocolo seguido se detalla a continuación:

- 1) Los lípidos totales aislados de *E. faecium* T136 y disueltos en la solución de cloroformo:metanol (9:1) se desecaron bajo una corriente de gas N<sub>2</sub>. El solvente residual se eliminó mediante centrifugación a vacío durante 2 h.
- 2) Los lípidos desecados (2,7 mg) se resuspendieron en el tampón MES 50 mM (pH 6,5) (en adelante, tampón de ensayo) suplementado con 170 mM del detergente octil-β-D-glucopiranosido (OG) y con 0,5 mM de CF (Molecular Probes) y se agitaron intermitentemente durante 1 h.
- 3) A continuación, la mezcla se depositó en una columna cromatográfica superfina (0,7 ×10 cm) que contenía 1 g de la resina de filtración en gel Sephadex G-50 (Sigma) y que había sido previamente equilibrada con 40 ml del tampón de ensayo y con 0,4 ml de solución de CF 0,5 mM en el mismo tampón.
- 4) Finalmente, la mezcla de lípidos-CF-detergente se depositó en la columna cromatográfica y se añadieron aproximadamente 40 ml del tampón de ensayo para la elución. Los liposomas cargados de CF eluyeron en el volumen del lecho de la columna, mientras que la CF libre y el detergente eluyeron más tarde.

**V.2.6.1.3. Efecto de la enterocina P en liposomas cargados de fluoresceína**

La CF es un compuesto fluorescente derivado de la fluoresceína, soluble en agua y con un peso molecular de 376 Da. Una propiedad de la CF es su capacidad de extinción (del inglés *self-quenching*), lo que implica que, a altas concentraciones, la fluorescencia de la CF se reduce. Por lo tanto, cuando la CF se encuentra dentro de los liposomas, la fluorescencia emitida es nula o muy pequeña; en cambio, si se produce su salida de los liposomas, por ejemplo tras su tratamiento con bacteriocinas o detergentes, su fluorescencia aumenta al diluirse en el medio y disminuir el fenómeno de extinción. Dentro de un cierto margen, la fluorescencia emitida por la CF es proporcional a su concentración (Winkowski *et al.*, 1996).

La determinación del efecto de la enterocina P en la liberación de CF de los liposomas se realizó añadiendo enterocina P (90 y 450 UB/ml) a una cubeta de cuarzo que contenía 5 µl de una dilución (1:6) de los liposomas cargados de fluoresceína en 2 ml de tampón MES 50 mM (pH 6,5) en agitación magnética continua. La fluorescencia se cuantificó en un espectrofluorímetro mod. F1T11 (Metuchen, NJ, EE.UU.) empleando longitudes de onda de 490 y 516 nm para la excitación y la emisión, respectivamente. El efecto de la bacteriocina en los liposomas se expresó como el porcentaje de liberación de CF, calculado mediante la ecuación  $[(F_t - F_o) / (F_{\infty} - F_o)] \times 100$ , donde  $F_t$  representa la fluorescencia en el tiempo  $t$ ,  $F_o$  es la fluorescencia inicial (previa a la adición de la bacteriocina o el detergente) y  $F_{\infty}$  es la fluorescencia máxima, obtenida tras el tratamiento de los liposomas con el detergente Triton X-100 (0,05%, v/v). La línea basal de fluorescencia se obtuvo añadiendo tampón MES 50 mM (pH 7,0) en lugar de enterocina P a los liposomas y se sustrajo de los valores de fluorescencia obtenidos tras la adición de la bacteriocina.

**V.2.6.2. Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos cargados de Rb<sup>86</sup> o K<sup>+</sup>.****V.2.6.2.1. Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos cargados de Rb<sup>86</sup>**

La preparación de liposomas sintéticos cargados de Rb<sup>86</sup> se realizó mediante la técnica de evaporación en fase inversa, según el procedimiento descrito por Szoka y Papahadjopoulos (1978). Para ello, se mezclaron 125 µl de DOPC y DOPG (10 mg/ml, disueltos en cloroformo/etanol) y se desecaron con una corriente de gas N<sub>2</sub>. El sedimento se resuspendió en 100 µl de etanol y se sometió a una nueva desecación con el objeto de eliminar por completo el cloroformo residual. Los

lípidos desecados se resuspendieron en 3 ml de éter dietílico y 0,5 ml de tampón NaP 50 mM (pH 7,0) y se agitaron vigorosamente. A continuación, se sometieron a evaporación en un rotavapor hasta obtener un volumen final de aproximadamente 200  $\mu$ l que contenía las denominadas “vesículas (liposomas) de evaporación en fase inversa”, caracterizadas por un volumen acuoso intracelular elevado. Los liposomas se incubaron con 20  $\mu$ l de Rb<sup>86</sup> (0,15 mCi/mmol) a temperatura ambiente durante toda la noche para permitir la incorporación del sustrato radiactivo. Finalmente, los liposomas se diluyeron en tampón NaP 50 mM (pH 7,0) a una concentración final de lípidos totales de 0,55 mg/ml y, tras tomar una muestra en el tiempo cero, se añadió la enterocina P (70 UB/ml) o el solvente. Seguidamente, se tomaron muestras (200  $\mu$ l) cada 5 min que se procesaron de la manera descrita en la sección V.2.3. (apartado 4), con la excepción de que los filtros se lavaron con tampón NaP 50 mM (pH 7,0). El experimento finalizó con la adición del detergente Triton X-100 (0,2%, v/v) que produjo la liberación del Rb<sup>86</sup> contenido en los liposomas.

#### ***V.2.6.2.2. Efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de iones K<sup>+</sup> en liposomas sintéticos***

La sonda fluorescente PBF1 (sección V.2.5) se empleó como sonda externa e interna para la determinación del movimiento transmembrana de iones K<sup>+</sup>. Para la preparación de liposomas sintéticos cargados de PBF1 (sonda interna) se siguió el protocolo descrito por Batzri y Korn (1973). Para ello, se mezclaron 125  $\mu$ l de DOPC y DOPG (10 mg/ml) disueltos en cloroformo/etanol y se desecaron bajo una corriente de gas N<sub>2</sub>. El sedimento se resuspendió en 100  $\mu$ l de etanol y se sometió a una nueva desecación. Los lípidos desecados se resuspendieron en 25  $\mu$ l de etanol y se inyectaron lentamente con una jeringa Hamilton en un tubo de Eppendorf que contenía 500  $\mu$ l de tampón KP 50 mM (pH 7,0) y PBF1 (8  $\mu$ M) en agitación. Seguidamente, la suspensión lipídica se centrifugó a 80.000 rpm y 4°C durante 15 min en una ultracentrífuga (Optima TLX Ultracentrifuge 120.000 rpm, Beckman) y el sedimento se resuspendió en un volumen pequeño ( $\approx$ 5  $\mu$ l) de tampón cloruro de colina 50 mM (con el pH ajustado a 7,0 con bis-tris propano 20 mM). Para la preparación de liposomas sintéticos con PBF1 como sonda externa se procedió de la misma manera, con la excepción de que los lípidos se inyectaron en el tampón en ausencia del PBF1.

Para determinar el efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos DOPC:DOPG (1:1) empleando PBF1 como sonda extracelular se depositaron 2  $\mu$ l de la suspensión de liposomas en una cubeta de cuarzo con 1,8 ml de tampón cloruro de colina 50 mM (con el pH ajustado a 7,0 con bis-

tris propano 20 mM), y, a continuación, se añadió la enterocina P (70 UB/ml) o el solvente. Finalmente, se añadió Triton X-100 (0,2%) para liberar el  $K^+$  de los liposomas. De manera análoga, el efecto de la enterocina P en liposomas cargados de PBFI se determinó añadiendo la enterocina P (70 UB/ml) o el solvente a una suspensión de 2  $\mu$ l de liposomas en el mismo tampón. Finalmente, se añadió Triton X-100 (0,2%) para liberar el PBFI y el  $K^+$  de los liposomas. La fluorescencia de las muestras se midió en un espectrofluorímetro mod. LS50 B (Perkin Elmer) termostatado a 30°C y con agitación continua, empleando longitudes de onda de 336 y 507 nm para la excitación y la emisión, respectivamente.

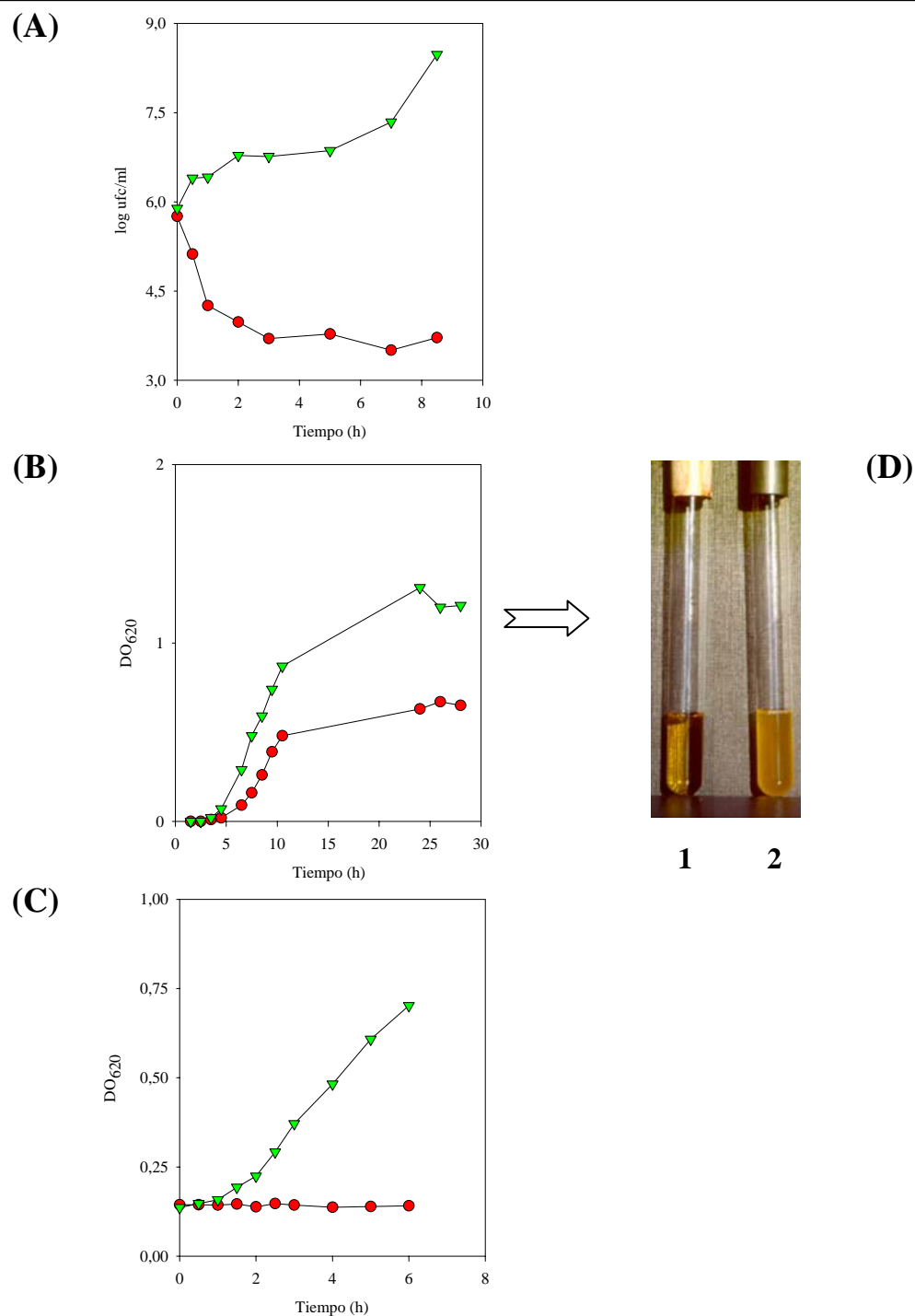
### V.3. RESULTADOS

#### V.3.1. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LA VIABILIDAD DE CULTIVOS DE *E. faecium* T136

Con objeto de establecer el modo de acción de la enterocina P en el microorganismo sensible *E. faecium* T136 se evaluó el efecto de  $2,5 \times 10^3$  UB/ml de la bacteriocina en el crecimiento de dicho microorganismo. Como se observa en la Fig. 5.1A, el cultivo control mostró su cinética de crecimiento habitual y alcanzó una concentración celular de  $10^8$  ufc/ml a las 8,5 h. En cambio, el cultivo tratado con enterocina P no fue únicamente incapaz de crecer sino que, además, el número de células viables disminuyó dos órdenes de magnitud (de  $10^5$  a  $10^3$  ufc/ml) durante el curso del experimento, lo que indica un modo de acción bactericida. Los recuentos efectuados a las 24 h mostraron que se mantenía la diferencia entre el cultivo control y el tratado, alcanzando éstos concentraciones celulares de  $10^9$  y  $10^6$  ufc/ml, respectivamente.

Cuando la concentración de enterocina P se incrementó al doble ( $5 \times 10^3$  UB/ml) no se detectaron células viables durante las 8,5 h siguientes al tratamiento. No obstante, los recuentos a las 24 h fueron similares a los obtenidos con el tratamiento de las células con  $2,5 \times 10^3$  UB/ml de enterocina P (aproximadamente  $10^6$  ufc/ml). Con el objetivo de determinar si las células supervivientes al tratamiento con  $5 \times 10^3$  UB/ml (36 h) eran resistentes a la enterocina P o se desarrollaban como consecuencia del agotamiento de la bacteriocina, estas células se cultivaron nuevamente en presencia o ausencia de  $2,5 \times 10^3$  UB/ml de enterocina P. Como puede observarse en la Fig. 5.1B, a pesar de que las células en presencia de enterocina P se desarrollaron más lentamente y alcanzaron una  $DO_{620}$  menor que las no tratadas, su crecimiento fue considerablemente superior al observado durante el tratamiento de células de *E. faecium* T136 que no habían sido expuestas previamente a la bacteriocina con la misma concentración de enterocina P (Fig. 5.1A).

Finalmente, para establecer si la enterocina P ejercía un efecto bacteriolítico en *E. faecium* T136, las células se trataron con  $1 \times 10^4$  UB/ml de la bacteriocina. Puesto que, como se muestra en la Fig. 5.1C, la  $DO_{620}$  del cultivo tratado con enterocina P no disminuyó durante el tratamiento, puede considerarse que la bacteriocina ejerce un efecto bactericida no lítico en las células sensibles.

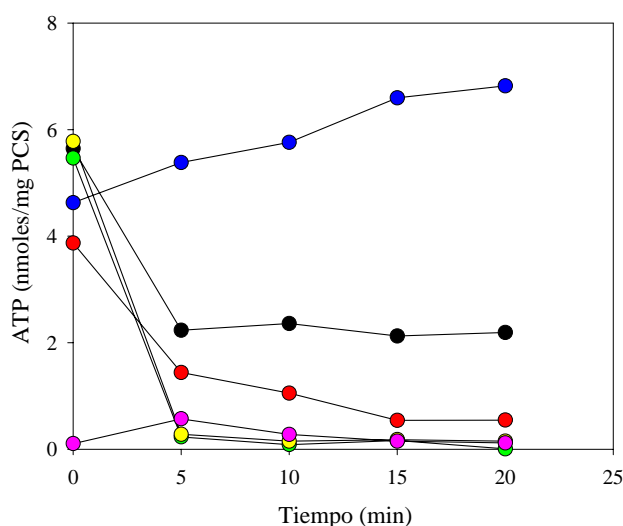


**Fig. 5.1.** (A) Recuentos de un cultivo de *E. faecium* T136 tratado con  $2,5 \times 10^3$  UB/ml de enterocina P (●) y sin tratar (▼). (B) Densidad óptica de un cultivo de *E. faecium* T136 previamente tratado con enterocina P ( $5 \times 10^3$  UB/ml) e inoculado en ausencia (▼) o en presencia (●) de  $2,5 \times 10^3$  UB/ml de enterocina P. (C) Densidad óptica de un cultivo de *E. faecium* T136 tratado con  $1 \times 10^4$  UB/ml de enterocina P (●) y sin tratar (▼). (D) Cultivo de 24 h de *E. faecium* T136 tratado con  $5 \times 10^3$  UB/ml de enterocina P (1) y sin tratar (2).



### V.3.2. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS NIVELES INTRA- Y EXTRACELULARES DE ATP

El efecto de diversas concentraciones de enterocina P (5-100 UB/ml) en la concentración intracelular de ATP de *E. faecium* T136, se muestra en la Fig. 5.2. Como puede observarse, el efecto de la enterocina P depende de la concentración y del tiempo de tratamiento. Así, cuando las células se trataron con 5 UB/ml se obtuvo una reducción del ATP intracelular del 61% en los primeros 5 min tras el tratamiento y no se observó una disminución adicional con el tiempo. Sin embargo, el tratamiento de las células con 20 UB/ml de enterocina P causó una reducción similar en los primeros 5 min (63%), que progresó hasta un 86% transcurridos 20 min. Cuando se emplearon concentraciones de 50 ó 100 UB/ml se obtuvo una reducción drástica del ATP intracelular (96%) a los 5 min de la adición de la bacteriocina, que llegó a alcanzar el 98% a los 20 min. Por otra parte, el ATP intracelular de células no tratadas y en presencia de glucosa (0,2%) aumentó ligeramente durante el curso del experimento, mientras que aquellas células que habían sido tratadas previamente al proceso de energización con 50 UB/ml de enterocina P durante 20 min no fueron capaces de incrementar su concentración de ATP intracelular tras la adición de glucosa. Ninguna de las concentraciones de enterocina P empleadas permitió la detección de ATP extracelular.



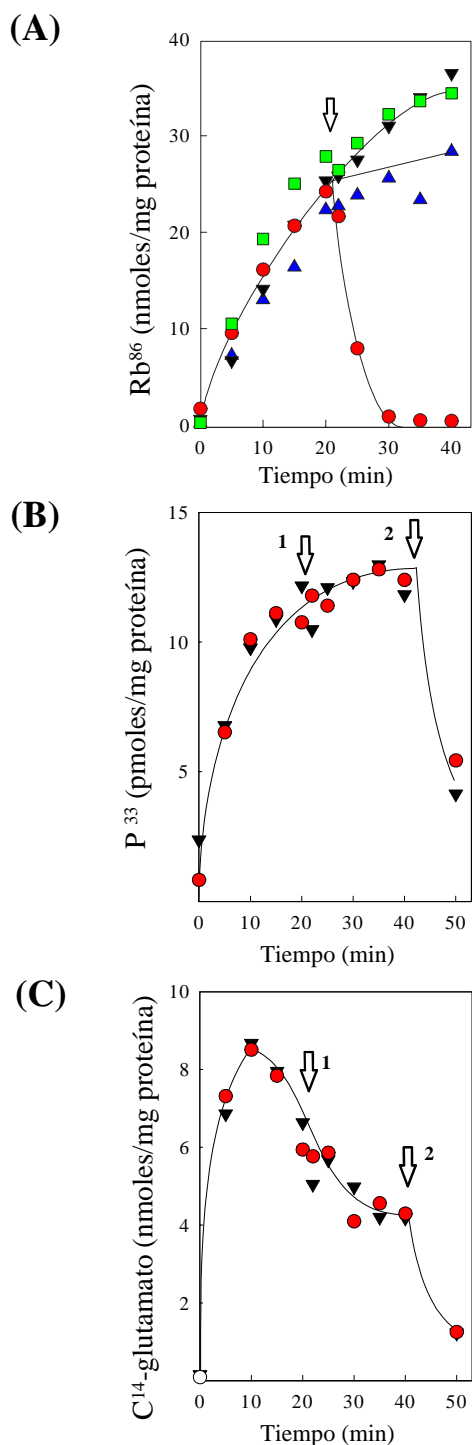
**Fig. 5.2.** Concentración de ATP intracelular de células de *E. faecium* T136 tratadas con 5 (símbolos de color negro), 20 (símbolos de color rojo), 50 (símbolos de color verde) y 100 UB/ml (símbolos de color amarillo) de enterocina P, sin tratar (símbolos de color azul), o tratadas con 50 UB/ml de enterocina P durante 20 min previamente al proceso de energización (símbolos de color rosa). Los resultados se expresan en nmoles ATP/mg peso celular seco, basados en el cálculo de que 1 ml de células de *E. faecium* T136 ( $DO_{620}=1$ ) corresponde a 0,72 mg de peso celular seco.

### V.3.3. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL TRANSPORTE DE SUSTRATOS RADIATIVOS EN CÉLULAS DE *E. faecium* T136

El efecto de la enterocina P (60 UB/ml) en el transporte del análogo del  $K^+$ ,  $Rb^{86}$ , se muestra en la Fig. 5.3A. En ausencia de la bacteriocina (control), las células de *E. faecium* T136 acumularon 36  $\mu$ moles del sustrato radiactivo por mg proteína celular tras 40 min; la concentración de  $Rb^{86}$  acumulada en *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136r tras el tratamiento con enterocina P fue similar (34  $\mu$ moles/mg proteína celular) o ligeramente inferior (28  $\mu$ moles/mg proteína celular) a la del control, respectivamente. El transporte de  $Rb^{86}$  cesó inmediatamente tras el tratamiento de *E. faecium* T136 con enterocina P, y, además, se produjo la salida rápida del sustrato preacumulado en las células, siendo la concentración intracelular final de  $Rb^{86}$  en *E. faecium* T136 aproximadamente 0,44  $\mu$ moles/mg proteína celular (0,01% de la del control). Cuando las células de *E. faecium* T136 se trataron con 120 UB/ml de enterocina P se obtuvo una velocidad de salida del  $Rb^{86}$  al medio exocelular muy similar a la producida por 60 UB/ml, siendo asimismo la concentración final intracelular del sustrato similar a la anterior.

En la Fig. 5.3.B se muestra el efecto de la enterocina P (60 UB/ml) en el transporte de  $Pi^{33}$ -fosfato en las células de *E. faecium* T136. La captación del sustrato radiactivo no resultó afectada por la adición de la bacteriocina y alcanzó un valor máximo similar al del control (aproximadamente 13 pmoles/mg proteína celular). Cuando las células de *E. faecium* T136 se trataron con 120 UB/ml de enterocina P, aunque siguió sin observarse la salida de  $Pi^{33}$ -fosfato, cesó la acumulación intracelular del mismo, siendo su concentración final en las células de *E. faecium* T136 tratadas con 120 UB/ml de enterocina P un 25% inferior a la del control. La adición de nisina (10  $\mu$ M) produjo la salida de la mayoría del  $Pi^{33}$ -fosfato preacumulado por las células.

Por último, en la Fig. 5.3C se muestran los resultados obtenidos con respecto al transporte de  $[C^{14}]$ -ácido glutámico en células de *E. faecium* T136 tratadas con enterocina P (60 UB/ml). Como puede observarse, a los 10 min de la adición de glucosa cesó el transporte de  $[C^{14}]$ -ácido glutámico y comenzó su salida al medio exocelular. Tras la adición de enterocina P, la velocidad de salida del sustrato radiactivo no presentó diferencias significativas en las células tratadas y no tratadas. Al igual que en el caso anterior, la nisina (10  $\mu$ M) causó la salida rápida de la práctica totalidad del  $[C^{14}]$ -ácido glutámico de las células de *E. faecium* T136.

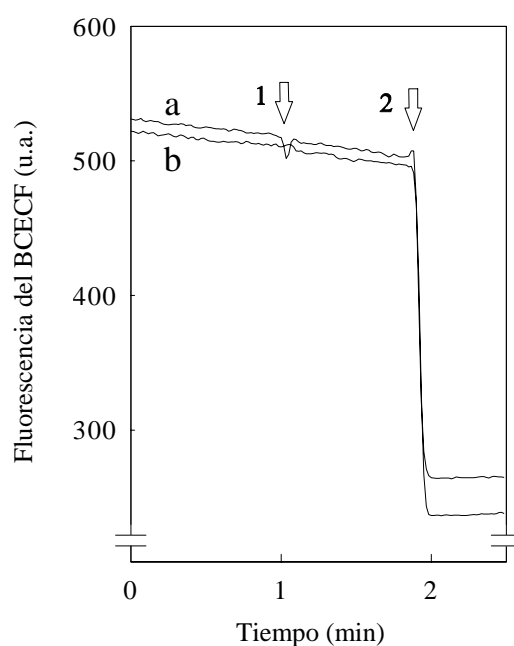


**Fig. 5.3. (A) Efecto de la enterocina P (60 UB/ml) en el transporte de Rb<sup>86</sup> en células de *E. faecium* T136 (—●—), *E. faecium* P13 (—■—) y *E. faecium* T136r (—▲—). La flecha indica el momento de adición a de la enterocina P a estas células o del solvente (—▼—) a las células de *E. faecium* T136; (B) y (C) Efecto de la enterocina P (60 UB/ml) en el transporte de C<sup>14</sup>-glutamato y Pi<sup>33</sup>-fosfato en células de *E. faecium* T136. La flecha 1 indica el momento de la adición de la bacteriocina (—●—) o el solvente (—▼—); la flecha 2 indica el momento de la adición de nisina (10 μM).**

### V.3.4. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LOS COMPONENTES DE LA FUERZA PROTÓN MOTRIZ

#### V.3.4.1. Efecto de la enterocina P en el gradiente de pH ( $\Delta$ pH) de células de *E. faecium* T136

El efecto de la enterocina P (60 UB/ml) en el  $\Delta$ pH de células de *E. faecium* T136 cargadas con la sonda fluorescente BCECF resuspendidas en el tampón KP 50 mM (pH 6,5) se muestra en la Fig. 5.4. Como puede observarse, la fluorescencia emitida por la sonda no se alteró tras la adición de la bacteriocina o el solvente, lo que indica que la enterocina P no produce movimientos transmembrana de  $H^+$ ; sin embargo, la adición posterior del ionóforo nigericina (intercambiador  $K^+/H^+$  que disipa el  $\Delta$ pH) provocó la rápida disminución de la señal fluorescente como consecuencia de la disminución del pH intracelular originada por la entrada de  $H^+$  al citoplasma .



**Fig. 5.4. Efecto de la enterocina P en el  $\Delta$ pH de células de *E. faecium* T136 cargadas de BCECF.** La flecha 1 indica el momento de la adición de la enterocina P (60 UB/ml, línea a) o del solvente (línea B). La flecha 2 indica el momento de la adición de nigericina (0,25  $\mu$ M). La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias (u.a.).

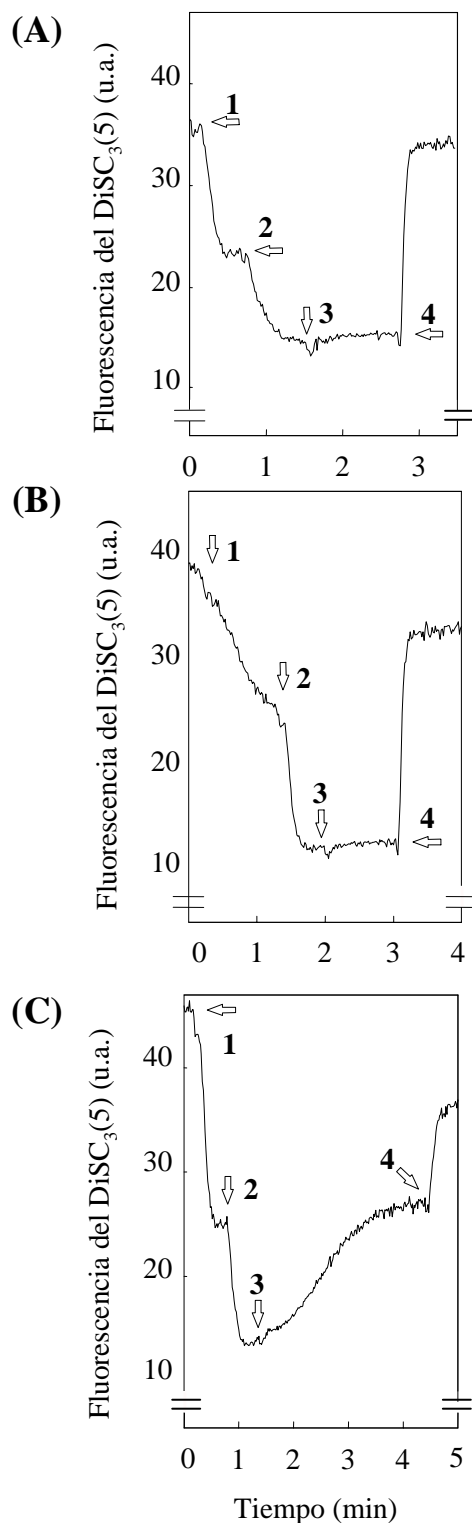
### V.3.4.2. Efecto de la enterocina P en el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de células de *E. faecium* T136

El efecto de la enterocina P en el  $\Delta\Psi$  de células de *E. faecium* T136 se determinó empleando la sonda fluorescente DiSC<sub>3</sub>(5). El DiSC<sub>3</sub>(5) se acumula en las membranas plasmáticas polarizadas, lo que resulta en la disminución de su fluorescencia debido al fenómeno de extinción (sección V.2.4.2.1). La disipación del  $\Delta\Psi$  provoca la liberación de la sonda al medio y la consiguiente recuperación de la emisión de fluorescencia.

En general, la adición sucesiva de glucosa y nigericina a las células provoca la hiperpolarización de sus membranas, mientras que la posterior adición de nisina causa la disipación del  $\Delta\Psi$  previamente inducido. En la Fig. 5.5A se observa que la adición de enterocina P (80 UB/ml) a las células de *E. faecium* T136 resuspendidas en tampón K-HEPES 50 mM (pH 7,0) origina un aumento progresivo de la emisión de la fluorescencia, lo que sugiere que se está produciendo la disipación del  $\Delta\Psi$ . El incremento adicional de fluorescencia obtenido tras la adición de nisina indica que la disipación ejercida por la bacteriocina tiene un carácter parcial. Cuando se añadió enterocina P (80 UB/ml) a células de *E. faecium* T136r y *E. faecium* P13 no se observó ningún efecto en el  $\Delta\Psi$ ; no obstante, al igual que en el caso anterior, la nisina causó su disipación (Figs. 5.5B y C, respectivamente). Finalmente, cuando las células de *E. faecium* T136 se resuspendieron en tampones sin K<sup>+</sup> (NaP 50mM, CsCl 50 mM y bis-tris propano 50 mM, pH 7,0) no se observó efecto de la enterocina P en la disipación del  $\Delta\Psi$ .

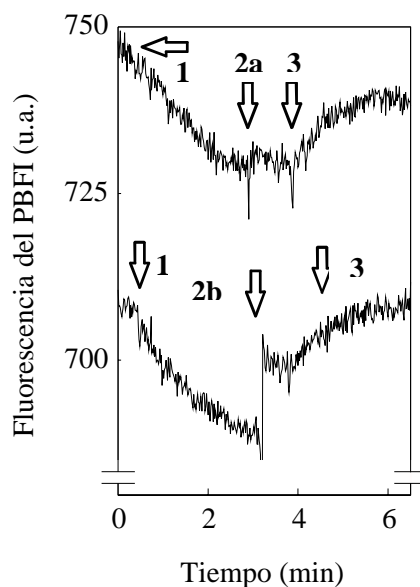
### V.3.5. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN EL MOVIMIENTO TRANSMEMBRANA DE IONES K<sup>+</sup> EN CÉLULAS DE *E. faecium* T136

El efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de iones K<sup>+</sup>, determinado mediante el empleo de una sonda fluorescente específica para este catión (PBFI), se muestra en la Fig. 5.6. La adición de glucosa (0,5%, p/v) resultó en la captación de K<sup>+</sup> por las células y, por tanto, en la disminución de la fluorescencia de la sonda como consecuencia de la disminución de la concentración exocelular de K<sup>+</sup>. El tratamiento de las células con enterocina P (60 UB/ml) provocó un aumento rápido de la emisión de fluorescencia, lo que sugiere que la bacteriocina induce la salida de iones K<sup>+</sup> desde el citoplasma al medio exocelular.



**Fig. 5.5. Efecto de la enterocina P en el  $\Delta\Psi$  de *E. faecium* P13 (A), *E. faecium* T136r (B) y *E. faecium* T136 (C).** A las células resuspendidas en tampón K-HEPES 50 mM (pH 7,0) se les añadió glucosa (0,5%, flechas 1), nigericina (0,25  $\mu$ M, flechas 2), enterocina P (80 BU/ml, flechas 3) y nisina (6  $\mu$ M, flechas 4). La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias (u.a.).

Finalmente, la adición de valinomicina, un ionóforo de  $K^+$ , equilibró la concentración de este catión a ambos lados de la membrana y provocó el incremento de la fluorescencia hasta su nivel previo a la energización de las células.

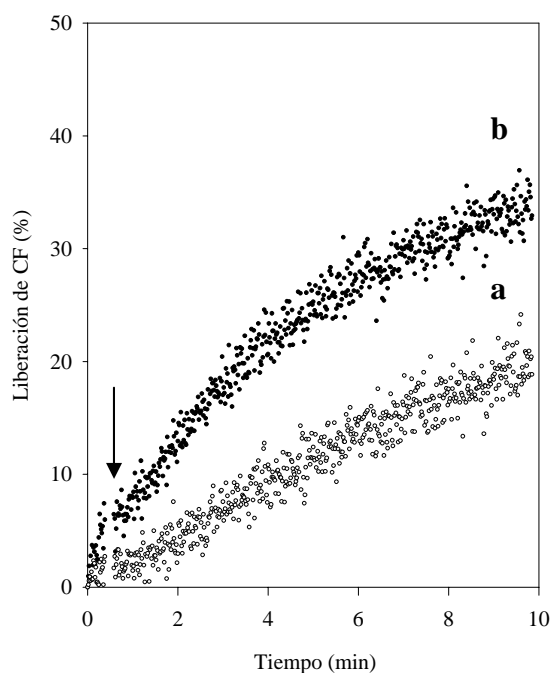


**Fig. 5.6. Efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de  $K^+$  en células de *E. faecium* T136.** A las células resuspendidas en tampón cloruro de colina 50 mM (pH 7,0) se les añadió glucosa (0,5%, flechas 1), solvente (flecha 2a) o enterocina P (60 UB/ml, flecha 2b) y valinomicina (0,25  $\mu$ M, flechas 3). La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias (u.a.).

### V.3.6. EFECTO DE LA ENTEROCINA P EN LIPOSOMAS

#### V.3.6.1. Efecto de la enterocina P en liposomas de *E. faecium* T136 cargados de carboxifluoresceína

El efecto de la enterocina P (90 y 450 UB/ml) en la liberación de CF atrapada en liposomas derivados de los lípidos totales de *E. faecium* T136 se muestra en la Fig. 5.7. La liberación de CF ocurrió inmediatamente tras la adición de enterocina P, y el porcentaje de liberación de este fluoróforo, calculado a partir de la liberación máxima inducida por el detergente TX-100, aumentó con el tiempo y con la concentración de bacteriocina empleada. La liberación de CF, especialmente cuando se emplearon 450 UB/ml de enterocina P, siguió una cinética bifásica, con una fase inicial de liberación rápida seguida de otra más lenta hasta alcanzar una meseta.



**Fig. 5.7. Efecto de la enterocina P en la liberación de CF de liposomas derivados de los lípidos totales de *E. faecium* T136.** La flecha indica el momento de la adición de la enterocina P: 90 UB/ml (a); 450 UB/ml (b).

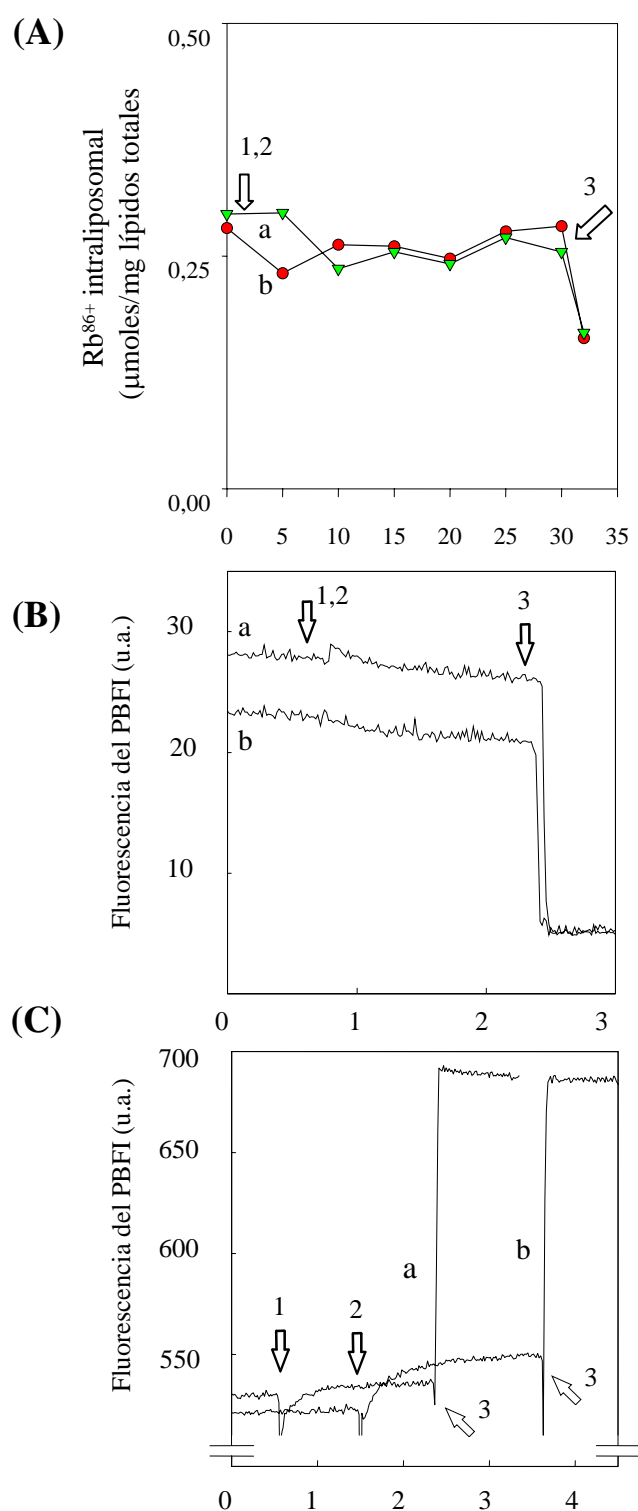
#### V.3.6.2. Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos cargados de $\text{Rb}^{86}$

El efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos de DOPC-DOPG (1:1, p/p) cargados de  $\text{Rb}^{86}$  se muestra en la Fig. 5.8A. Como puede observarse, la concentración intraliposomal de  $\text{Rb}^{86}$  se mantuvo constante tras la adición de enterocina P (70 UB/ml), lo que indica que la bacteriocina no altera la permeabilidad de estos liposomas. La liberación parcial del sustrato radiactivo del interior de los liposomas se obtuvo tras la adición del detergente TX-100.

#### V.3.6.3. Efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de iones $\text{K}^+$ en liposomas sintéticos

El efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de iones  $\text{K}^+$  contenidos en liposomas sintéticos de DOPC-DOPG (1:1, p/p) se muestra en las Figs. 5.8B y C.





**Fig. 5.8. Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos de DOPC-DOPG (1:1) cargados de Rb<sup>86</sup> (A), PBF1 (B) o K<sup>+</sup> (C).** Las flechas 1 y 2 indican el momento de la adición de la enterocina P (70 UB/ml) (líneas a) o del solvente (líneas b); la flecha 3 indica el momento de la adición de TX-100 (0,2%). La fluorescencia de la sonda se indica en unidades arbitrarias (u.a.).

La adición de enterocina P (70 UB/ml) no tuvo efecto en el movimiento transmembrana de iones  $K^+$  de los liposomas sintéticos. Cuando se empleó PBFI como sonda interna, tan solo se observó la disminución de la emisión de fluorescencia tras la adición de TX-100, ya que el detergente causó la salida rápida del  $K^+$  contenido en los liposomas (Fig. 5.8B). De manera similar, cuando la sonda PBFI se empleó externamente a los liposomas, se produjo un ligero incremento de la fluorescencia tras la adición de la enterocina P y del solvente, que fue despreciable en comparación con la originada por el TX-100 (Fig. 5.8C).

En consecuencia, es posible afirmar que la enterocina P, a concentraciones del mismo orden que las que inducen la disipación del  $\Delta\Psi$  y el movimiento transmembrana de iones  $K^+$  de células de *E. faecium* T136, carece de efecto en liposomas sintéticos de DOPC-DOPG (1:1), como queda demostrado por la ausencia de liberación de  $Rb^{86}$  y la inexistencia de conducción de iones  $K^+$  a través de la membrana.

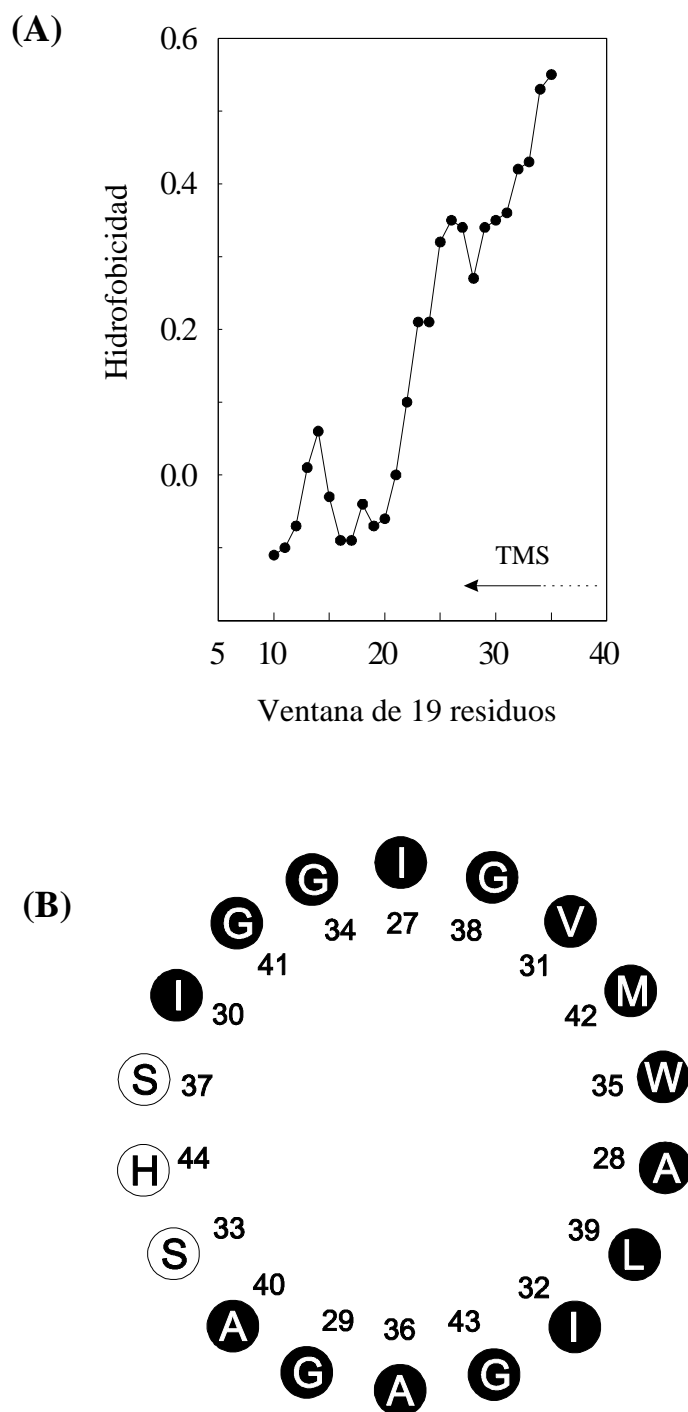
## V.4. DISCUSIÓN

### V.4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P EN CÉLULAS DE *E. faecium* T136

La enterocina P ejerció un efecto bactericida en las células de *E. faecium* T136, originando a las 3 h una disminución del 99% en los recuentos del indicador tratado con respecto a los del control sin tratar. Puesto que no se observó un descenso de la densidad óptica de los cultivos tratados (Fig. 5.1C), la enterocina P ejercería su efecto antimicrobiano sin causar la lisis de las células sensibles. Estos resultados son similares a los obtenidos con otras bacteriocinas de la clase II, que, generalmente, no inducen lisis celular (Chikindas *et al.*, 1993; Venema *et al.*, 1993; Tahara *et al.*, 1996b). La lisis causada en determinadas condiciones por algunas bacteriocinas, como la nisina, Pep5 y plantaricina C, podría ser un efecto secundario y/o paralelo debido a la inducción de la liberación de las autolisinas de la pared celular (González *et al.*, 1996) y dependería de la sensibilidad del microorganismo y de la dosis de bacteriocina empleada (Gálvez *et al.*, 1989; Mendoza *et al.*, 1999).

El incremento de los recuentos de *E. faecium* T136 tras 24 h de tratamiento con enterocina P podría deberse a la inactivación de la bacteriocina, a la disminución de su concentración por debajo del nivel umbral necesario para ejercer actividad antimicrobiana y/o al desarrollo de resistencia en las células previamente sensibles; en este sentido, se ha detectado la aparición de resistencia espontánea a la nisina en células de *Ls. monocytogenes*, lo que se ha correlacionado con la alteración de la membrana celular (Ming y Daeschel, 1995; Mazzotta y Montville 1997), de la pared celular (Davies *et al.*, 1996) o de ambas (Crandall y Montville, 1998; Mendoza *et al.*, 1999). El hecho de que el crecimiento de las células de *E. faecium* T136 previamente tratadas con enterocina P en presencia de esta bacteriocina sea superior al de las células que no habían estado en contacto con la bacteriocina, y ligeramente inferior al del cultivo control (sin enterocina P), sugiere la existencia de una población mixta compuesta por células resistentes a la enterocina P y células supervivientes al tratamiento debido al agotamiento de la bacteriocina.

Al igual que otros péptidos antimicrobianos naturales, la enterocina P posee un elevado pI ( $\approx 8,1$ ) y un carácter anfipático. Como se observa en la Fig. 5.9A, la hidrofobicidad de la molécula aumenta progresivamente hacia el extremo C-terminal, existiendo un segmento transmembrana con



**Fig. 5.9. Perfil de hidrofobicidad de la enterocina P (A) y representación en rueda helicoidal de los residuos 27 a 44 de la enterocina P (B).** El perfil de hidrofobicidad se calculó para una ventana de 19 aminoácidos empleando la escala de hidrofobicidad de Eisenberg (1984); TMS, situación del hipotético segmento transmembrana de la enterocina P. En la rueda helicoidal (Schiffer y Edmundson, 1967) se representan los aminoácidos apolares y polares con círculos de color negro y blanco, respectivamente.

una alta hidrofobicidad en la región C-terminal. Dicha región podría adoptar una estructura en hélice  $\alpha$  hidrofóbica (Fig.5.9B) e insertarse en la membrana de las células sensibles, causando la alteración de su permeabilidad. La anfipaticidad y la posibilidad de formar estructuras en hélice  $\alpha$  son características que permiten la interacción de las bacteriocinas con las membranas celulares y su permeabilización (Eisenberg, 1984; Montville y Bruno 1994). Dicha estructura aparece en bacteriocinas de la clase II como en la bacteriocina de dos componentes lactococcina G (Hauge *et al.*, 1998a), en la leucocina A (Gallagher *et al.*, 1997), en la carnobacteriocina B2 (Wang *et al.*, 1999), y en la plantaricina A (Hauge *et al.*, 1998b), así como en ciertos péptidos antimicrobianos eucarióticos (Hancock *et al.*, 1995).

Con el objeto de comprobar la hipótesis de la posible actuación de la enterocina P en la membrana de las células sensibles se procedió, en primer lugar, a determinar su efecto en los componentes de la PMF. La enterocina P (80 UB/ml) disipó de una manera concentración-dependiente el  $\Delta\Psi$  de las células de *E. faecium* T136 en tampón K-HEPES. La disipación se produjo de manera selectiva, pues las células del microorganismo productor (inmunes) y las células resistentes de *E. faecium* T136 no resultaron afectadas por la enterocina P (Fig. 5.5, sección V.3.4.2). Asimismo, la disipación del  $\Delta\Psi$  se observó tan solo en tampones con  $K^+$ . En este sentido, la enterocina P se asemeja al ionóforo móvil valinomicina. La valinomicina es un antibiótico natural producido por *Streptomyces* sp. que cataliza el uniporte electrogénico de los iones  $Cs^+$ ,  $Rb^+$ ,  $K^+$  y  $NH_4^+$ , y que posee una afinidad por el  $Na^+$  al menos  $10^4$  veces menor que por el  $K^+$ . La razón aparente de esta especificidad radica en que los iones  $Na^+$  no hidratados (forma en la que el ionóforo realizaría el uniporte) son demasiado pequeños para interaccionar de manera eficiente con los grupos carbonilo de la valinomicina, por lo que la energía de la formación del complejo  $Na^+$ -valinomicina no es suficiente para equilibrar la necesaria para que se pierda el agua de hidratación (Nicholls y Ferguson, 1992).

La enterocina P fue incapaz de causar la disipación del  $\Delta pH$  en las células del microorganismo sensible tratadas con concentraciones de bacteriocina del mismo orden de magnitud que las que indujeron la disipación del  $\Delta\Psi$  (Fig. 5.4, sección V.3.4.1), lo que sugiere que los poros formados por la bacteriocina no son permeables al paso de  $H^+$ .

La disipación de la PMF se ha propuesto como el mecanismo de acción común de las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Bruno y Montville, 1993; Montville y Bruno, 1994). Los antibióticos nisina (Bruno *et al.*, 1992), mutacina (Chikindas *et al.*, 1995b) y plantaricina C (González *et al.*, 1996), y las bacteriocinas de la clase II lactococcina A (van Belkum *et al.*, 1991b),

lactococcina B (Venema *et al.*, 1993), pediocina PA-1 (Chikindas *et al.*, 1993), acidocinas 8912 y 1132 (Tahara *et al.*, 1996a,b) y plantaricinas EF y JK (Moll *et al.*, 1999b), disipan los dos componentes de la PMF. En general, la concentración de bacteriocina necesaria para disipar el  $\Delta\text{pH}$  es menor que la requerida para la disipación del  $\Delta\Psi$ . Sin embargo, de manera similar a la enterocina P, la lactococcina G (Moll *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1998b) y la lacticina 3147 (McAuliffe *et al.*, 1998) únicamente disiparon el  $\Delta\Psi$ . En ambos casos, en células que no habían sido tratadas con valinomicina (que disipa el  $\Delta\Psi$  y mantiene una PMF compuesta únicamente por el  $\Delta\text{pH}$ ), la adición de la bacteriocina produjo un aumento del  $\Delta\text{pH}$ , probablemente como consecuencia de un incremento en la extrusión de  $\text{H}^+$  por la ATP-sintetasa en respuesta a la disipación del  $\Delta\Psi$  (Moll *et al.*, 1998b). En este sentido se ha observado que la despolarización de la membrana (debida, por ejemplo, a la entrada de iones  $\text{K}^+$ ) provoca un aumento del  $\Delta\text{pH}$ , que puede compensar transitoriamente la disipación del  $\Delta\Psi$  (Bakker y Mangerich, 1991). En células tratadas con lacticina 3147 (1.200 UB/ml), se observó una disminución del  $\Delta\text{pH}$  tras 4 min de tratamiento, probablemente como consecuencia de la disminución del ATP intracelular (McAuliffe *et al.*, 1998) o de que la membrana se vuelve permeable a los  $\text{H}^+$  debido a efectos secundarios como el hinchamiento celular (Bakker y Mangerich, 1991). Estos resultados sugieren que la lactococcina G y la lacticina 3147, al igual que la enterocina P, forman canales impermeables a los  $\text{H}^+$ .

Aunque en la mayoría de los casos la disipación del  $\Delta\Psi$  ocurre de manera específica en las células sensibles, en otros es un proceso no selectivo, pues tanto las células sensibles como las resistentes resultan afectadas en el mismo grado (Bennik *et al.*, 1997b; McAuliffe *et al.*, 1998). Cuando se analizó la composición lipídica de las células sensibles e insensibles a la nisina y a la pediocina PA-1 se observó que éstas diferían principalmente en la proporción de fosfolípidos neutros y glicolípidos de sus membranas; puesto que el proceso inicial de unión de las bacteriocinas está gobernado fundamentalmente por interacciones electrostáticas entre los fosfolípidos negativos de las membranas bacterianas y las cargas positivas de las bacteriocinas (Driessen *et al.*, 1995a; Demel *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b), éstas podrían interaccionar de manera similar con las membranas de las células, independientemente de su sensibilidad al péptido antimicrobiano. No obstante, la oligomerización y la formación de poros ocurrirían más eficazmente en las células sensibles que en las insensibles, probablemente como consecuencia de la composición total de la membrana, en la que juegan un papel importante tanto los lípidos como las proteínas (Bennik *et al.*, 1997). Por lo tanto, el papel que ejerce la disipación del  $\Delta\Psi$  en la inhibición del crecimiento puede tener una importancia relativa. En este sentido, González *et al.* (1996) observaron que la disipación

del  $\Delta\Psi$  por la acción de la valinomicina tenía un efecto mucho menor en la actividad glicolítica celular que la disipación del  $\Delta pH$ . Asimismo, cuando el  $\Delta\Psi$  es disipado por la adición al medio de cultivo de  $K^+$  y valinomicina se observa únicamente una ligera inhibición del crecimiento celular (Moll *et al.*, 1999a,b).

A continuación, se evaluó el efecto de la enterocina P en el estado energético de *E. faecium* T136 mediante la medición de sus niveles de ATP. La bacteriocina originó una disminución de hasta un 98% del ATP intracelular que no se acompañó de la salida de ATP al medio exocelular (Fig. 5.2, sección V.3.2). La disminución del ATP intracelular sin un aumento concomitante del ATP exocelular es un fenómeno que se ha observado como consecuencia de la acción de numerosas bacteriocinas de la clase II en células sensibles (Abee *et al.*, 1994; Chen y Montville, 1995; Barrena-González, 1996; Moll *et al.*, 1996; Bennik *et al.*, 1998), lo que sugiere que los poros formados por estas bacteriocinas no tienen un tamaño suficiente para permitir el paso del ATP (peso molecular = 507 Da) o bien que presentan especificidad para determinados sustratos. Esta situación contrasta con el efecto de los lantibióticos nisina (Winkowski *et al.*, 1994; Montville *et al.*, 1999) y plantaricina C (González *et al.*, 1996), que forman poros inespecíficos y producen la liberación de ATP al medio exocelular. No obstante, en el caso de la nisina, el ATP detectado en el medio exocelular corresponde únicamente al 20% de la pérdida total, por lo que es posible que otros mecanismos participen en su disminución (Winkowski *et al.*, 1994). En este sentido, la principal causa de la disminución del ATP intracelular originada por las bacteriocinas podría ser el desplazamiento del equilibrio de la reacción de hidrólisis hacia el ADP debido a la pérdida de iones fosfato a través de la membrana (Abee *et al.*, 1994), o bien a la aceleración de su hidrólisis en un intento de contrarrestar la disipación de la PMF (Chen y Montville, 1995).

La disminución del ATP intracelular presenta una alta correlación con la pérdida de la viabilidad celular (Winkowski *et al.*, 1994; Chen y Montville, 1995). En este sentido, a pesar de que la nisina y la pediocina PA-1 causan una disipación similar del  $\Delta\Psi$  de las células sensibles e insensibles, la perturbación severa de la membrana y la disminución de los niveles de ATP y de la tasa de glucólisis ocurre únicamente en las células sensibles (Bennik *et al.*, 1997b).

Con el objeto de determinar el efecto de la disipación del  $\Delta\Psi$  y la disminución del ATP intracelular en los procesos de transporte de determinados sustratos en *E. faecium* T136, se emplearon los compuestos radiactivos  $Rb^{86}$ ,  $Pi^{33}$ -fosfato y  $[C^{14}]$ -ácido glutámico. En este contexto, es conocido que la PMF, o uno de sus componentes, proporciona en una gran variedad de organismos la energía necesaria para la translocación de muchos sustratos mediante los

denominados sistemas de transporte secundario (Konings y Michels, 1980); asimismo, también existen en las bacterias lácticas una serie de sistemas de transporte que dependen del ATP u otros compuestos del fosfato (Poolman *et al.*, 1987b,c). Así, por ejemplo, el transporte de los sustratos aniónicos fosfato y glutamato en *L. lactis* tiene lugar mediante sistemas unidireccionales, dependientes del ATP e independientes de la magnitud y composición de la PMF (Poolman *et al.*, 1987a, b, c).

La adición de enterocina P (60 UB/ml) a células de *E. faecium* T136 energizadas con glucosa no disminuyó la tasa de transporte de fosfato ni causó la liberación del fosfato preacumulado (Fig. 5.3B, sección V.3.3). Sin embargo, cuando la concentración de enterocina P se duplicó, se produjo una marcada deceleración de la incorporación de fosfato con respecto a la del control, a pesar de seguir sin observarse la salida del anión. La disminución en la incorporación de fosfato podría deberse a una alteración más severa de los niveles de ATP en presencia de una mayor concentración de enterocina P, mientras que el hecho de no detectarse la salida de fosfato a una concentración del mismo orden de magnitud que la que causa la disipación del  $\Delta\Psi$  sugiere que la alteración de la permeabilidad de la membrana se debe a la formación de poros específicos o con un tamaño insuficiente para permitir la salida del anión. De manera similar a la enterocina P, la lactococina G y las plantaricinas EF y JK no liberan el fosfato preacumulado en las células sensibles, a pesar de que esta última bacteriocina presenta conductividad para otros aniones, tales como el glutamato o la sonda fluorescente BCECF (Moll *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1999b). Puesto que los poros formados por la enterocina P no son permeables al fosfato es poco probable que la disminución del ATP intracelular observada en presencia de la bacteriocina se deba al desplazamiento del equilibrio de la hidrólisis de ATP. Contrariamente a la enterocina P, la lactacina F y la pediocina PA-1 produjeron la liberación de fosfato simultáneamente con la disminución del ATP intracelular, lo que podría deberse a la formación de poros inespecíficos (Abee *et al.*, 1994; Chen y Montville, 1995).

En lo que se refiere al glutamato, se observó que, 10 min después de energizar las células de *E. faecium* T136 con glucosa, comenzó a disminuir su captación y a producirse su liberación (Fig. 5.3.C, sección V.3.3). Esta observación podría estar relacionada con la regulación del transporte de glutamato por el pH intracelular y la concentración intracelular de iones  $K^+$ , de manera similar a lo observado en *L. lactis* (Poolman *et al.*, 1987a). El hecho de que la velocidad de liberación del sustrato no varíe significativamente en presencia o ausencia de la enterocina P sugiere que, al igual que en el caso anterior, los poros son impermeables al paso del anión debido a su selectividad o a su tamaño. El efecto de las bacteriocinas de la clase II en el transporte y/o liberación de glutamato es



variable. Así, por ejemplo, la lactococcina A (van Belkum *et al.*, 1991b), la mesentericina Y105 (Maftah *et al.*, 1993), la lactococcina B (Venema *et al.*, 1993), la pediocina PA-1 (Chikindas *et al.*, 1993), las acidocinas 8912 y JCM1132 (Tahara *et al.*, 1996a,b) y las plantaricinas JK (Moll *et al.*, 1999b) bloquean el transporte de glutamato y causan su liberación de las células sensibles. Por otra parte, la acidocina J1229 induce la liberación de glutamato únicamente cuando se emplea a altas concentraciones (Tahara y Kanatani, 1996), las plantaricinas EF causan una liberación de glutamato muy lenta en comparación con su análogo de dos componentes (plantaricinas JK) (Moll *et al.*, 1999b) y la lactococcina G, a pesar de bloquear la captación de glutamato, no produce su liberación, incluso cuando se emplea a concentraciones elevadas (Moll *et al.*, 1996).

A pesar de no producir la liberación de estos aniones, la enterocina P (60 UB/ml) afectó severamente al transporte de  $\text{Rb}^{86}$  (Fig. 5.3A, sección V.3.3). La adición de la bacteriocina provocó no sólo el cese total del transporte del catión, sino también su liberación rápida de las células de *E. faecium* T136. Como era previsible, las células del microorganismo productor no resultaron afectadas por la bacteriocina y continuaron acumulando  $\text{Rb}^{86}$  a la misma velocidad que el control. Aunque las células de *E. faecium* T136r no liberaron el sustrato radiactivo preacumulado tras la adición de la enterocina P, continuaron acumulando éste a una velocidad mucho más baja que la del control y el productor, lo que sugiere que la resistencia de estas células no se debería a la inaccesibilidad de la bacteriocina a las células diana, sino a algún otro mecanismo que imposibilitaría el transporte de ciertos sustratos al interior celular, pero que permitiría a la célula mantener un estado energético viable. Este hecho estaría relacionado con la observación de que la disipación del  $\Delta\Psi$  por la enterocina P sucede únicamente en las células sensibles.

La liberación del análogo del  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^{86}$ ) de las células de *E. faecium* T136, junto con el hecho de que la enterocina P disipa el  $\Delta\Psi$  sin provocar el movimiento de  $\text{H}^+$ , sugiere que la membrana se hace permeable al  $\text{K}^+$ . Para comprobar esta hipótesis, se empleó la sonda fluorescente PBFI. El aumento de la fluorescencia emitida por la sonda en respuesta a la adición de la enterocina P indica que la bacteriocina produce, en efecto, la liberación de  $\text{K}^+$  al medio exocelular (Fig. 5.6, sección V.3.5).

El  $\text{K}^+$  es el principal catión intracelular, pudiendo alcanzar concentraciones citoplasmáticas de 600-800 mM en células de *L. lactis* (Poolman *et al.*, 1987a; Moll *et al.*, 1996). El  $\text{K}^+$  participa, entre otros procesos, en la regulación del pH citoplasmático y de la fuerza iónica (Konings *et al.*, 1989). El principal sistema de captación de  $\text{K}^+$  en *Lactococcus* sp. es una ATPasa que media la translocación de iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Rb}^+$  y que es responsable de la rápida despolarización de la membrana

observada tras la adición de glucosa a las células (Poolman *et al.*, 1987a; Konings *et al.*, 1989). La entrada de cationes posibilita la extrusión de  $H^+$  mediante el consumo del ATP producido en la glicolisis, lo que conduce a la restauración del  $\Delta\Psi$  y al aumento transitorio del pH intracelular y el  $\Delta pH$  (Bakker y Mangerich, 1981). La acción bactericida de la lactococcina G (Moll *et al.*, 1996), lactostrepcina 5 (Zajdel *et al.*, 1985), lactacina F (Abee *et al.*, 1994), lacticina 3147 (McAuliffe *et al.*, 1998) y plantaricina EF (Moll *et al.*, 1999b) está mediada fundamentalmente por la liberación del  $K^+$  intracelular. El papel fundamental de este ión en la homeostasis celular, junto con el consumo rápido del ATP intracelular para restablecer su gradiente, explicarían la acción inhibidora de estas bacteriocinas, así como de la enterocina P, en las células sensibles.

#### V.4.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENTEROCINA P EN LIPOSOMAS

La adición de enterocina P (90 y 450 UB/ml) a los liposomas contruidos con los lípidos totales de *E. faecium* T136 causó la liberación rápida de la CF intraliposomal (Fig. 5.7, sección V.3.6.1). No obstante, la liberación máxima del fluoróforo representó únicamente el 30% de la inducida por el Triton X-100, lo que sugiere que la permeabilización de la membrana es transitoria. Contrariamente, la enterocina P (70 UB/ml) no permeabilizó los liposomas sintéticos compuestos por DOPC:DOPG (1:1) cargados con  $K^+$  o PBFI. Asimismo, la bacteriocina fue incapaz de causar la liberación del  $Rb^{86}$  preacumulado en liposomas sintéticos con la composición mencionada (Fig. 5.8, sección V.3.6.3).

La posibilidad de que la enterocina P hubiera actuado de manera no específica (acción detergente) en los liposomas cargados de CF es poco probable, puesto que la liberación de la sonda se produjo de una manera gradual y siguió una cinética de saturación dependiente de la concentración de bacteriocina empleada, lo que contrasta con la acción rápida “todo o nada” de los detergentes.

La ausencia de actividad permeabilizadora de la enterocina P en los liposomas sintéticos podría deberse a que la bacteriocina requiere una composición lipídica determinada, probablemente con una mayor concentración de fosfolípidos aniónicos (DOPG), que facilite su unión inicial a la bicapa lipídica mediante interacciones electrostáticas. En este sentido, la pediocina PA-1 se une preferentemente a liposomas compuestos por fosfolípidos aniónicos (DOPG) y dicha unión disminuye a medida que decrece la carga negativa de los liposomas (Chen *et al.*, 1998). Asimismo, la tasa de liberación de CF inducida por la nisina en liposomas elaborados con lípidos de *E. coli* es

menor que la obtenida en los liposomas derivados de los lípidos totales de *Ls. monocytogenes*, compuestos fundamentalmente por fosfolípidos ácidos (Winkowski *et al.*, 1996).

En cualquier caso, la actividad permeabilizadora de liposomas de la enterocina P contrasta con su actividad *in vivo*, caracterizada por la formación de poros con una alta selectividad para ciertos cationes monovalentes, siendo por lo tanto muy reducida la probabilidad de que la CF, un compuesto aniónico y con un tamaño molecular considerable (376 Da) pueda atravesar dichos poros. Driessen *et al.* (1995) observaron una contradicción aparente entre la acción de la nisina *in vivo* y en liposomas compuestos de fosfolípidos zwitteriónicos (PC); así, a pesar de que la nisina actúa como un transportador de aniones en liposomas compuestos de PC, este efecto es poco probable *in vivo*, puesto que las membranas bacterianas contienen concentraciones considerables de fosfolípidos aniónicos que lo antagonizarían.

Adicionalmente, la posibilidad de que la enterocina P requiera la presencia de un receptor de naturaleza proteica e hidrofóbica que se hubiera copurificado con los lípidos totales del microorganismo sensible no puede ser totalmente descartada (Montville y Bruno, 1994). No obstante, la necesidad de tal receptor contrastaría *a priori* con el amplio espectro de acción de la enterocina P. La existencia en las células sensibles de un receptor para otras bacteriocinas de la clase II se ha propuesto en el caso de las lactococcinas A, B y G (van Belkum *et al.*, 1991; Venema *et al.*, 1993; Moll *et al.*, 1996), mesentericina Y105 (Maftah *et al.*, 1993) y leucocina A (Gallagher *et al.*, 1997). Por el contrario, la nisina y la pediocina PA-1 presentan actividad permeabilizadora en liposomas derivados de lípidos de *Ls. monocytogenes* (Chen *et al.*, 1997b; Winkowski *et al.*, 1996) o sintéticos (García-Garcerá *et al.*, 1993; Driessen *et al.*, 1995a; Chen *et al.*, 1997a, 1998) y la plantaricina C (González *et al.*, 1996) y la termofilina 13 (Marciset *et al.*, 1997) en liposomas sintéticos, lo que sugiere que su acción no requiere la existencia de receptores específicos. El estudio de la composición de la membrana de células sensibles e insensibles a la acción de la nisina o de la pediocina PA-1 mostró que no existía una correlación directa entre la composición lipídica de sus membranas y su sensibilidad a dichas bacteriocinas. Por lo tanto, sería la composición total de la membrana, incluyendo sus proteínas, la que influiría en la formación de poros *in vivo* (Bennik *et al.*, 1997b). La participación de ciertos grupos de las cabezas polares de los fosfolípidos o de componentes de la pared celular en la determinación de la especificidad de las bacteriocinas es otra alternativa (Zajdel *et al.*, 1985; Maftah *et al.*, 1993; Montville y Bruno, 1994; Moll *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997a); en este sentido, se ha observado que la plantaricina A, un eslabón evolutivo intermedio entre una bacteriocina y un factor de inducción, ejerce su acción antimicrobiana

mediante una interacción no quirál, lo que excluye la participación de receptores proteicos en el proceso de reconocimiento de las células sensibles (Fimland, 1998; Hauge *et al.*, 1998b).

Por último, la disparidad de los resultados obtenidos *in vivo* y con los sistemas liposomales empleados en este trabajo podría explicarse parcialmente debido a que: (i) los liposomas son sistemas modelo muy diferentes de las células vegetativas; (ii) la formación de poros *in vivo* es un fenómeno pluricausal y complejo; y (iii) la tasa de liberación de CF puede no estar directamente correlacionada con la letalidad celular (Winkowski *et al.*, 1996; Bennik *et al.*, 1997b).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la enterocina P, un péptido anfipático y con capacidad para formar una hélice  $\alpha$  hidrofóbica en su región C-terminal, ejerce su acción antimicrobiana en las células del microorganismo sensible *E. faecium* T136 mediante la permeabilización de su membrana plasmática. Aunque la bacterocina no afecta primariamente al  $\Delta pH$ , disipa eficazmente el  $\Delta\Psi$ , probablemente debido a la formación de canales en la membrana con una alta selectividad para el  $K^+$ . Como consecuencia de la liberación del  $K^+$  al medio exocelular, la célula consume ATP para intentar reestablecer una concentración adecuada de este importante catión intracelular; lo que conduce al agotamiento del ATP intracelular, al cese de numerosas funciones celulares que dependen de esta fuente energética, como por ejemplo, el transporte de ciertos metabolitos, y, en última instancia, a la muerte celular.

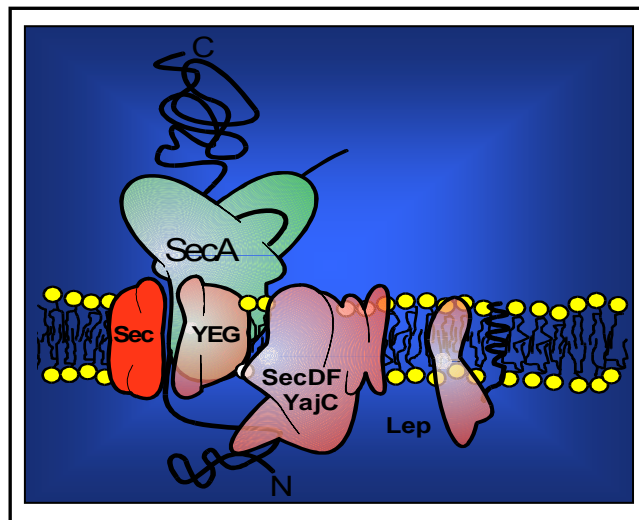
## *CAPÍTULO VI*

### *ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO Y SECRECIÓN DE LA ENTEROCINA P MEDIANTE LA RUTA GENERAL DE SECRECIÓN*



## VI.1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, las bacterias lácticas y/o sus metabolitos se han convertido en una alternativa real al empleo de los conservantes químicos tradicionales (Stiles, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Cintas y Casaus, 1998). Dado que existen bacterias lácticas atractivas desde un punto de vista industrial que no son bacteriocinogénicas (Biet *et al.*, 1998) la producción heteróloga de bacteriocinas en cepas con interés



tecnológico que carezcan de dicha propiedad podría contribuir a la difusión de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios a escala industrial. Para que la producción de bacteriocinas sea eficiente es necesario: (i) un nivel de expresión adecuado del gen estructural correspondiente; (ii) que la cepa productora sea inmune o resistente a la bacteriocina; y (iii) disponer de un sistema de transporte que asegure su procesamiento y secreción al medio exocelular; puesto que el transporte supone un factor limitante para la producción heteróloga de muchas proteínas (Simonen y Palva, 1983; Holo *et al.*, 1991; van Belkum *et al.*, 1991a; Horn *et al.*, 1998), el estudio de la estructura y del mecanismo de acción de la maquinaria transportadora podría contribuir a mejorar dicha producción.

Todas las células están separadas del medio externo por una membrana lipídica que, además de mantener un gradiente electroquímico entre el citoplasma y el medio exocelular, constituye una barrera con permeabilidad selectiva al paso de nutrientes y otros sustratos. No obstante, existen componentes, como por ejemplo, ciertas proteínas, que, una vez sintetizadas en el citoplasma deben ejercer su función fuera de la célula, y, por lo tanto, necesitan sistemas de secreción a través de la membrana que no comprometan su permeabilidad (van der Does, 2000). En las bacterias, la mayoría de las proteínas extracitoplasmáticas se transportan mediante un complejo proteico de proteínas Sec, que es homólogo a sistemas de secreción encontrados en eucariotas y arqueobacterias (Pohlschröder *et al.*, 1997).

En este capítulo se analiza el transporte y procesamiento de la preproenterocina P, una bacteriocina sintetizada con un péptido señal (SP), mediante los sistemas *sec* de *E. coli* y *B. subtilis*.

## VI.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### VI.2.1. CLONACIÓN DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENTEROCINA P DE *E. faecium* P13 EN *E. coli*

#### VI.2.1.1. Aislamiento y visualización del DNA total de *E. faecium* P13

El DNA total de *E. faecium* P13 se aisló mediante el siguiente protocolo:

- 1) Las células de 4 ml de un cultivo de *E. faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 30°C hasta una  $DO_{620} = 0,7$  se obtuvieron por centrifugación a 12.000 rpm y 4°C durante 10 min y se lavaron con agua desionizada.
- 2) A continuación, las células se resuspendieron en 500 µl de tampón Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM (tampón TE), pH 8,0, y se trataron con lisozima (20 mg/ml) a 55°C durante 10 min.
- 3) Seguidamente, se añadieron proteinasa K (0,8 mg/ml) y SDS (0,5% p/v) y se incubó la mezcla a 60°C durante 5 min.
- 4) Con objeto de precipitar el DNA total, se le adicionaron a la suspensión anterior 250 µl de acetato sódico 3M, pH 5,2, y 500 µl de isopropanol al 100%.
- 5) Finalmente, el DNA precipitado se recogió de la suspensión con una varilla de vidrio, se desecó a 37°C durante 5 min, se resuspendió en 200 µl de agua desionizada y se conservó a -20°C hasta su empleo.

La visualización del DNA en geles de agarosa se realizó como se describió en la sección III.2.8.2.

#### VI.2.1.2. Amplificación mediante PCR del gen de la preproenterocina P de *E. faecium* P13

Con objeto de amplificar el gen estructural de la preproenterocina P (*entP*) de *E. faecium* P13 se diseñaron los cebadores EntP-F y EntP-R, cuya secuencia se muestra en la Tabla VI.1.



**Tabla VI.1. Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados en la amplificación de *entP***

Nombre Referencia	Secuencia 5'→ 3'	Longitud	
EntP-F	GCGGGTACCAGGAAACATCCATGGGAAAAAAATTATTTAGTTTAGC S.D.	46	Este trabajo
EntP-R	GCGGAATTCTTAATGTCCCATACCTGCC	28	Este trabajo
La secuencia nucleotídica de <i>entP</i> se obtuvo de los trabajos de Cintas <i>et al.</i> (1997) y Casaus (1998). En color rojo, azul y verde se indican las secuencias diana de los enzimas de restricción <i>KpnI</i> , <i>NcoI</i> y <i>EcoRI</i> , respectivamente. La región Shine-Dalgarno (S.D.) aparece subrayada.			

Las reacciones de amplificación (50 µl) se llevaron a cabo básicamente como se describió en la sección III.2.9.2, empleando el siguiente programa de amplificación:

- Etapa 1: 4 min a 92°C (1 ciclo)
- Etapa 2: 1 min a 92°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C (30 ciclos)
- Etapa 3: 5 min a 72°C (1 ciclo)

### VI.2.1.3. Restricción del producto de PCR obtenido con los cebadores EntP-F y EntP-R y del vector pET401

Las reacciones de restricción del producto de PCR y del vector pET401 (2.961 pb) con los enzimas *KpnI* y *EcoRI* (Roche Molecular Biochemicals) se realizaron según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Tras una incubación en un termobloque a 37°C durante 2 h, los fragmentos de restricción obtenidos se purificaron con el *kit* comercial “QIAquick PCR purification” (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo especificado en el manual del producto.

#### **VI.2.1.4. Ligación de los fragmentos de restricción en el vector pET401 digerido con *KpnI* y *EcoRI***

Los fragmentos de restricción del producto de PCR se ligaron en el vector pET401 mediante una reacción a temperatura ambiente durante 2 h catalizada por el enzima DNA-ligasa del bacteriófago T4 (Roche). El vector recombinante, denominado pET1899, se muestra en la Fig. 6.1. Como control, se realizó una reacción paralela en ausencia del fragmento de restricción.

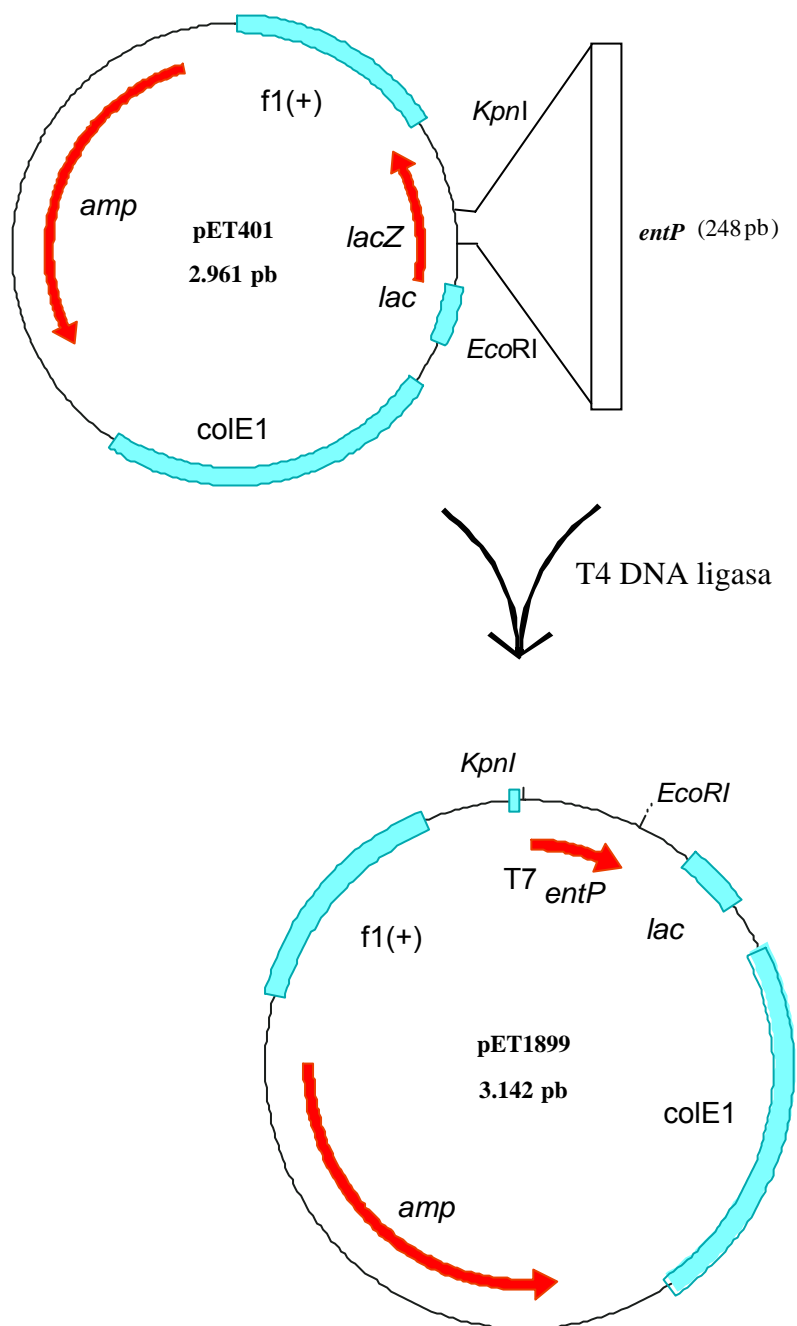
#### **VI.2.1.5. Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ con el vector pET1899**

El vector pET1899 se introdujo en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Promega, Madison, EE.UU.), transformadas químicamente mediante el protocolo de Sambrook *et al.* (1989), de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 1) A las mezclas de ligación (20  $\mu$ l) anteriores (vector linealizado únicamente o vector linealizado y fragmentos de restricción) se les añadieron las células competentes (100  $\mu$ l) y se incubaron en hielo durante 5 min. Las células procedían de un *stock* de *E. coli* DH5 $\alpha$  conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 2) A continuación, las muestras se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 min.
- 3) Seguidamente, se añadió 1 ml de caldo Luria-Bertani (LB) (5 g/l NaCl, 10 g/l Bacto triptona y 5 g/l de extracto de levadura, con el pH ajustado a 7,0) y las muestras se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h.
- 4) Tras la incubación, se sembraron alícuotas de las reacciones de transformación en placas de agar LB con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) que se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

#### **VI.2.1.6. Aislamiento del vector pET1899**

A partir de las placas de agar LB se seleccionaron colonias que se inocularon en tubos con 2,5 ml de caldo LB con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Los tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm durante 24 h y se emplearon para inocular frascos con 50 ml del mismo caldo que se incubaron bajo las mismas condiciones durante la noche. El aislamiento del DNA plasmídico de los cultivos transformantes se realizó empleando un *kit* comercial para la purificación de plásmidos (Qiagen). La secuencia del gen clonado se comprobó mediante su secuenciación por el método dideoxi (sección III.2.9.4).



**Fig. 6.1. Estrategia de clonación de *entP* en el vector pET401 y obtención del vector recombinante pET1899.** Abreviaturas: *amp*, gen que codifica resistencia a ampicilina; *colE1*, origen de replicación de *E. coli*; *entP*, gen estructural de la preproenterocina P; f1 (+), origen de replicación del fago f1; *lac*, promotor del gen de la  $\beta$ -galactosidasa; *lacZ*, gen que codifica el fragmento amino-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa.

### VI.2.2. EXPRESIÓN *in vitro* DE LA PREPROENTEROCINA P

Con el objeto de obtener preproenterocina P marcada radiactivamente se empleó el *kit* comercial de transcripción/traducción *in vitro* para DNA circular “*E. coli* T7 S30 Extract System” (Promega) y cisteína radiactiva ( $[^{35}\text{S}]$  Cys, 1.200 Ci/mmol) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

#### VI.2.2.1. Reacciones de transcripción/traducción *in vitro*

Las reacciones se realizaron en un laboratorio de radioisótopos empleando el siguiente protocolo:

- 1) A un tubo de reacción se le añadieron 1, 2, 3 ó 4  $\mu\text{g}$  de DNA molde (vector recombinante), 15  $\mu\text{l}$  de una mezcla 1 mM de los aminoácidos esenciales (excepto Cys), 20  $\mu\text{l}$  de la premezcla S30 (ribonucleótidos, tRNA, fosfoenolpiruvato, IPTG y sales), 15  $\mu\text{l}$  del extracto T7 S30 (T7 RNA polimerasa y otros componentes necesarios para la transcripción) y 1  $\mu\text{l}$  de  $[\text{S}^{35}]$  Cys. Finalmente, el volumen de la reacción se completó hasta 50  $\mu\text{l}$  con agua libre de nucleasas.
- 2) Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 2 h.
- 3) Transcurrida la incubación, las reacciones se detuvieron depositando los tubos en hielo durante 5 min.
- 4) Por último, con el objeto de precipitar la proteína sintetizada, se añadió a las mezclas de reacción 1 volumen de ácido tricloroacético (TCA) (20%, v/v) y se incubaron las muestras en hielo durante 30 min. A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min y se resuspendió el sedimento proteico en 1 ml de acetona a -20°C. Seguidamente, se centrifugó de nuevo a 14.000 rpm durante 3 min, se desecó el sedimento obtenido durante 5 min a 37°C y, finalmente, se resuspendió en la mitad de su volumen original en una solución de urea 6 M, pH 7,5.

### VI.2.2.2. Análisis de los resultados de las reacciones de transcripción/traducción *in vitro*

#### VI.2.2.2.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS y tricina

La técnica de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS y tricina (*Tricine-SDS-PAGE*, del inglés *Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) permite una correcta separación electroforética de proteínas y péptidos de pequeño tamaño (entre 1 y 100 kDa) (Schägger y von Jagow, 1987). En el presente trabajo se emplearon geles de poliacrilamida al 20% con dos fases:

- Gel de concentración: con una longitud aproximada de 1 cm desde la base del peine formador de pocillos y con la siguiente composición:

- 0,6 ml de un *stock* de acrilamida 48%-bisacrilamida 1,5%
- 1,6 ml de tampón del gel (TrisHCl 3M con SDS al 0,3%, pH 8,25)
- 2,4 ml de agua desionizada
- 0,05 ml de persulfato amónico (PSA) (10%, p/v)
- 0,005 ml de TEMED

- Gel de separación: de mayor longitud que la fase anterior, constituye el resto del gel y presenta la siguiente composición:

- 4,65 ml de acrilamida
- 3,75 ml de tampón del gel
- 1,2 ml de glicerol estéril (con 87% de pureza)
- 1,65 ml de agua desionizada
- 0,1 ml de PSA (10%, p/v)
- 0,01 ml de TEMED

Los tampones empleados en la electroforesis fueron los siguientes:

- Tampón del gel: Tris-HCl 3 M con SDS (0,3%, p/v), pH 8,45
- Tampón del ánodo (en el exterior de la cámara ): TrisHCl 0,2 M, pH 8,9.
- Tampón del cátodo (en el interior de la cámara): Tris base 0,1 M, Tricina, 0,1 M y SDS (0,1%, p/v), pH 8,25.
- Tampón de carga: 2,4 ml agua desionizada; 1 ml de TrisHCl 0,5 M, pH 6,8; 1,6 ml de SDS (10%, p/v); 0,4 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol; y 1ml de azul de bromofenol (0,05%, p/v).

Para el análisis de la proteína de las muestras se empleó 1 µl de las muestras precipitadas, que se diluyó en el tampón de carga y se calentó a 80°C durante 7 min. Para determinar el tamaño de las bandas proteicas se empleó el estándar marcado radiactivamente “Rainbow Low Weight Marker,  $^{14}\text{C}$ ” (BioRad). La electroforesis del gel se realizó a un voltaje de 100 mV durante aproximadamente 2 h.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas presentes en los geles se fijaron en una solución en agua desionizada de ácido acético (10%, v/v) y metanol (40%, v/v) durante 15 min. A continuación, los geles se lavaron dos veces con agua desionizada, se depositaron en una solución de salicilato (125 g/l de ácido salicílico y 37,13 g/l de NaOH, pH 7,0) y se incubaron durante 10 min en agitación suave. Finalmente, los geles se lavaron de nuevo con agua desionizada y se desecaron en un desecador a vacío a 75°C durante aproximadamente 45 min.

#### **VI.2.2.2. Autorradiografía**

Tras la electroforesis y secado de los geles, las bandas de proteínas marcadas radiactivamente se visualizaron mediante autorradiografía. Para ello, los geles se introdujeron en un cartucho con una pantalla intensificadora de la radiación y sobre ellos se dispuso una película radiográfica modelo BioMax MR (Kodak). Los cartuchos se mantuvieron a -80°C durante la noche, y, posteriormente, se revelaron en una reveladora automática.

### **VI.2.3. TRANSLOCACIÓN Y/O PROCESAMIENTO *in vitro* DE LA PREPROENTEROCINA P**

Con el objeto de determinar si la preproenterocina P se procesa y/o transporta a través de la membrana plasmática de las células de *E. faecium* P13 mediante la ruta *sec* (sección II.2.4.2), se realizaron diversos ensayos de translocación *in vitro* empleando vesículas de membrana y la maquinaria de translocación de *E. coli*.

#### **VI.2.3.1. Aislamiento de vesículas de la membrana interna de *E.coli***

Las vesículas de la membrana interna (IMVs, del inglés *Inner Membrane Vesicles*) se obtuvieron a partir de *E. coli* SF100, una cepa defectiva en la proteasa de la membrana externa OmpT (Baneyx y Georgiou, 1990), empleando el método descrito por Swaving *et al.* (1999). El protocolo empleado se describe a continuación:

- 1) Las células de un cultivo de *E. coli* SF100 desarrollado en 1,5 l de caldo LB a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{620} \approx 1,2$  se obtuvieron por centrifugación a  $10.000 \times g$  durante 5 min y se resuspendieron en 30 ml de tampón TrisHCl 50 mM, pH 8,0 (tampón A).
- 2) A continuación, las células se rompieron mediante tratamiento en una prensa francesa ( $2 \times 1.000 \text{ psi} \approx 11 \text{ Kg/mm}^2$ ). A diferencia de las vesículas intactas, la mayoría de las vesículas de membrana sometidas a este tratamiento presentan la peptidasa líder (Lep) (sección II.2.4.2.1) en su cara externa, por lo que se denominan IOVs (del inglés *Inside-Out Vesicles*). La suspensión celular obtenida se centrifugó a  $5.000 \times g$  durante 5 min, obteniéndose un sedimento con las células intactas y otros detritos celulares, y un sobrenadante con las membranas celulares.
- 3) Seguidamente, se centrifugó el sobrenadante a 40.000 rpm durante 90 min, y el sedimento resultante, que contenía las membranas celulares externas e internas, se resuspendió en 1,5 ml de tampón A.
- 4) Las membranas internas se separaron de las externas mediante centrifugación a 80.000 rpm durante 30 min en un gradiente de densidad de sacarosa (0,5; 0,5; y 1 ml de soluciones de sacarosa al 35; 45; y 55% (p/v), respectivamente, en tampón A) empleando una ultracentrífuga de mesa “Optima TLX Ultracentrifuge 120,000 rpm” (Beckman).
- 5) Tras la centrifugación, la fase con un 45% de sacarosa, en la que se habían depositado las IMVs de *E. coli* SF 100, se transfirió a un tubo nuevo, se diluyó en tampón A (volumen final  $\approx 2,5$  ml), , y se repartió en dos alícuotas. Una de ellas ( $\approx 1$  ml) se trató con 2 ml de tampón A con urea 6 mM para desnudar a las IMVs de la proteína SecA, mientras que la otra ( $\approx 1,5$  ml) no se sometió a ningún tratamiento. Las dos alícuotas se centrifugaron de nuevo en la ultracentrífuga a 80.000 rpm durante 20 min, y los sedimentos resultantes se resuspendieron en 100 y 150  $\mu\text{l}$  de tampón A con 20% de glicerol, respectivamente. Finalmente, las IMVs se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su empleo.

#### **VI.2.3.2. Ensayo de translocación de la preproenterocina P *in vitro* empleando la maquinaria de translocación de *E. coli***

Los ensayos de translocación proteica se realizaron mediante una modificación del método descrito por van der Does *et al.* (2000). El protocolo empleado se detalla a continuación:

- 1) A un tubo de reacción se le añadieron 5 µl de tampón B 10× (1:2 K-HEPES 1 M, pH 7,6; 1:5 50 KCl 1,5 M; 1:10 BSA (seroalbúmina bovina) 50 mg/ml; 1:10 DTT (ditiotreitól) 1 M; y 1:10 Mg(Ac)<sub>2</sub> 0,2 M); 3,3 µl de ATP 30 mM; 3,2 µl de *Energy Mix* (fosfato de creatina 160 mM y creatinquinasa 0,8 mg/ml disueltas en K-HEPES 200 mM, pH 7,6 con DTT 20 mM); 1 µl de SecA (1 mg/ml) de *E. coli*; 1 µl (16-32 mg proteína/ml) de IMVs desnudas de SecA de *E. coli* SF100 o de *E. coli* sobreexpresando el complejo SecYEG (van der Does *et al.*, 1996) y 1 µl de preproenterocina P marcada radiactivamente. El volumen de la reacción se completó hasta 50 µl con agua libre de nucleasas.
- 2) Tras incubación a 37°C durante 20 min, se transfirieron 45 µl de las mezclas de reacción a tubos de Eppendorf preenfriados en hielo que contenían 5 µl de proteasa K (1 mg/ml), que se incubaron en hielo durante 15 min.
- 3) A continuación, se añadieron 150 µl de TCA (10%, v/v) para precipitar la proteína de las muestras (sección VI.2.2.1, apartado 4).
- 4) Finalmente, el sedimento se resuspendió en 10 µl de tampón de carga 1× (sección VI.2.2.2.1) y los resultados del ensayo de translocación se analizaron mediante *Tricine-SDS-PAGE* y autorradiografía (sección VI.2.2.2).

### VI.2.3.3. Otros ensayos de procesamiento y/o translocación de la preproenterocina P

#### VI.2.3.3.1. Ensayos de transcripción-traducción-translocación *in vitro* acopladas

Para la realización de este ensayo se llevaron a cabo dos reacciones de transcripción-traducción *in vitro* (una en presencia, A, y otra en ausencia, B, de IMVs) como se describió en la sección VI.2.2.1, con la excepción de que, tras 15 min de incubación, a la reacción A se le añadieron 4 µl de vesículas de *E.coli* SF100 con SecA, y, a la B, 4 µl de agua desionizada. Seguidamente, cada reacción se subdividió en dos alícuotas (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) con el mismo volumen; a las alícuotas A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub> se les añadió 1 µl de azida de sodio 20 mM, un inhibidor de SecA (Huie y Silhavy, 1995), mientras que a las A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub> se les añadió 1 µl de agua desionizada. A continuación, las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 20 min.

Una vez finalizada la incubación, se procedió al tratamiento de las muestras con proteinasa K. Para ello, se tomaron 9 µl de cada uno de los tubos de reacción A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, y se trataron con 1 µl de proteasa K (1 mg/ml). Como control, se trataron muestras del mismo volumen con 1 µl de



agua desionizada. Los tubos con y sin proteasa K se incubaron en hielo durante 15 min, y, a continuación, se procedió a la precipitación de la proteína (secciones VI.2.2.1, apartado 4) y a la visualización de los resultados obtenidos (sección VI.2.2.2, respectivamente).

Adicionalmente, se efectuaron ensayos de transcripción-traducción-translocación *in vitro* acopladas empleando SecA de *B. subtilis* (van der Wolk *et al.*, 1993) y vesículas de células de *E. coli* transformadas con el vector pET822 que sobreexpresan el complejo SecYEG de *B. subtilis* (Swaving *et al.*, 1999).

#### **VI.2.3.3.2. Ensayo del procesamiento de la preproenterocina P por las peptidasas líder de *E. coli* y de *B. subtilis***

Para el ensayo del procesamiento de la preproenterocina P por *E. coli* se emplearon IMVs derivadas de células de *E. coli* SF100 que sobreexpresan Lep de *E. coli* (Wolfe *et al.*, 1983). Estas IMVs se diluyeron en tampón A (sección VI.2.3.1) a una concentración final de 1 mg proteína/ml; a continuación, se añadió 1 µl de preproenterocina P a 45 µl de las vesículas en presencia del detergente octil-glucósido (OG) (40 mM) o de tampón A. Como control negativo, se preparó una reacción en ausencia de vesículas y, como control positivo, se emplearon 0,25 µl del prepéptido de *E. coli* proOmpA (Crooke *et al.*, 1988) marcado radiactivamente con I<sup>125</sup> según el protocolo de van Wely *et al.* (1998).

Por otra parte, se realizaron ensayos del procesamiento de la preproenterocina P por la peptidasa del péptido señal SipS (van Dijl *et al.*, 1992) de *Bacillus amyloliquefaciens*. Para ello, se prepararon mezclas de reacción que contenían 1 µl de preproenterocina P y Triton X-100 (concentración final 0,1 y 0,5%, v/v) en tampón K-HEPES 50 mM, pH 9,0, y se trataron con SipS semipurificada (concentración final 32,5 y 65 µg/ml) (proporcionada por J. D. H. Jongbloed, Departamento de Genética Molecular, Universidad de Groningen, Holanda). En este caso, se empleó como control negativo una reacción en ausencia de SipS y, como control positivo, 0,25 µl del prepéptido de *E. coli* I<sup>125</sup>-proOmpA.

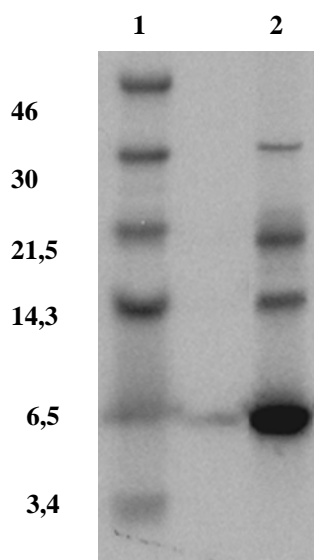
Las reacciones en presencia de Lep de *E. coli* o de SipS de *B. amyloliquefaciens* se incubaron a 37°C durante 20 min; a continuación, se precipitaron las proteínas (sección VI.2.2.1, apartado 4) y se visualizaron los resultados del ensayo de procesamiento como se describió en la sección VI.2.2.2, con la excepción de que las muestras que contenían ProOmpA se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 12%.

### VI.3. RESULTADOS

#### VI.3.1. CLONACIÓN DE *entP* Y EXPRESIÓN *in vitro* DE LA PREPROENTEROCINA P

El producto de PCR obtenido empleando el DNA total de *E. faecium* P13 y los cebadores EntP-F y EntP-R se trató con los enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRV* y se clonó en el vector pET401 digerido con los mismos enzimas, obteniéndose el vector recombinante pET1899 (sección VI.2.1.4, Fig. 6.1). La secuenciación nucleotídica del inserto introducido en el vector pET1899 demostró que se trataba de *entP* (Fig. 3.6, sección III.3.8).

Puesto que el vector pET1899 contenía el promotor para la RNA polimerasa del fago T7 delante del gen de la preproenterocina P y que el fragmento clonado poseía una región S.D., se empleó un *kit* comercial para la obtención *in vitro* de preproenterocina P marcada radiativamente con [<sup>35</sup>S]-Cys. La Fig.6.2 muestra el resultado de la precipitación con TCA de la proteína obtenida en una reacción de transcripción-traducción *in vitro* típica. La preproenterocina P se visualiza como una banda gruesa situada a la altura de la banda de 6,5 kDa del marcador. La aparición de bandas de tamaño molecular superior al del prepropéptido podría deberse a que éste forma agregados multiméricos de distintos tamaños moleculares.

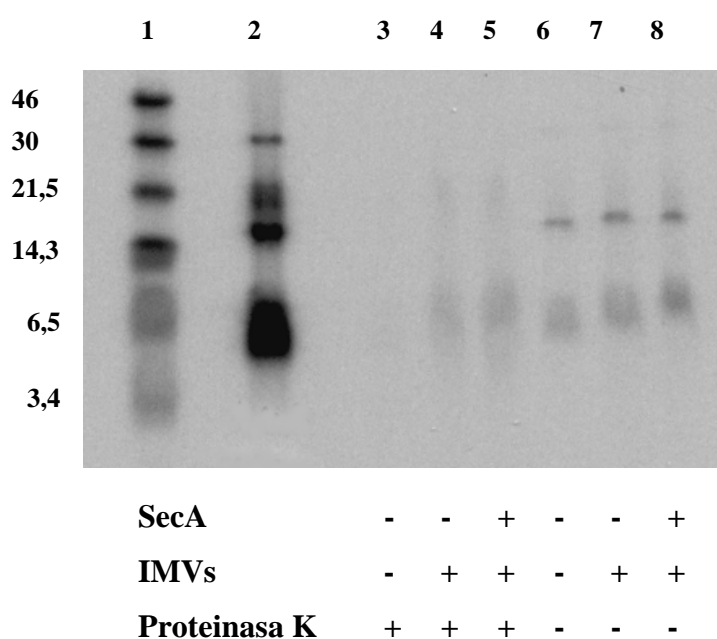


**Fig. 6.2. Síntesis de [<sup>35</sup>S]-Cys-preproenterocina P mediante transcripción-traducción *in vitro*.** (1) Marcador de tamaño molecular “Rainbow Low Weight Marker, <sup>14</sup>C” (2 µl); (2) Preproenterocina P precipitada con TCA (1 µl).

### VI.3.2. ENSAYOS DE TRANSLOCACIÓN *in vitro* DE LA PREPROENTEROCINA P

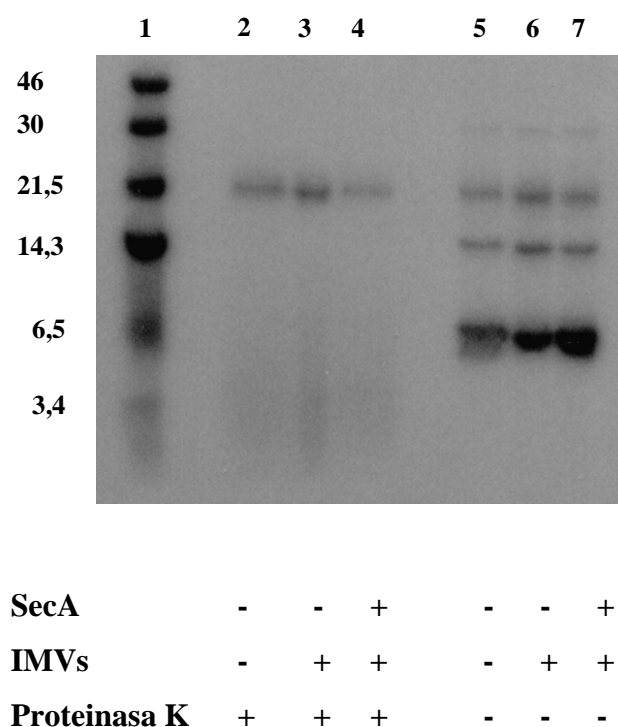
Los ensayos de translocación de [ $^{35}$ S]-Cys-preproenterocina P ( $\approx 7,5$  kDa) al interior de IMVs de *E. coli* y/o su procesamiento por Lep para proporcionar el péptido maduro ( $\approx 4,5$  kDa) se realizaron empleando diversas estrategias. En todas ellas se realizó un ensayo de accesibilidad a la proteinasa K, basado en que la translocación del prepropéptido al interior de las IMVs proporcionaría un fragmento de aproximadamente 7,5 kDa protegido de la acción de este enzima. Por otra parte, puesto que la [ $^{35}$ S]-Cys aparece únicamente en el SP de la molécula, si se produjera el procesamiento del precursor proteico por Lep acoplado al proceso de translocación, aparecería un fragmento de aproximadamente 3 kDa protegido de la proteinasa K.

Inicialmente, los ensayos de translocación se realizaron empleando IMVs desnudas (sección VI.2.3.1) y SecA de *E. coli*. En la Fig. 6.3 puede observarse que no se produjo procesamiento de la preproenterocina P, ya que no se detectó ninguna banda de proteína del tamaño esperado ( $\approx 3$  kDa) en las muestras tratadas con proteinasa K, ni translocación al interior de las IMVs.



**Fig. 6.3. Ensayo de translocación *in vitro* de la preproenterocina P empleando IMVs y SecA de *E. coli*.** (1) Marcador de tamaño molecular; (2) preproenterocina P (control negativo); (3-8) preproenterocina P con las adiciones especificadas en la figura.

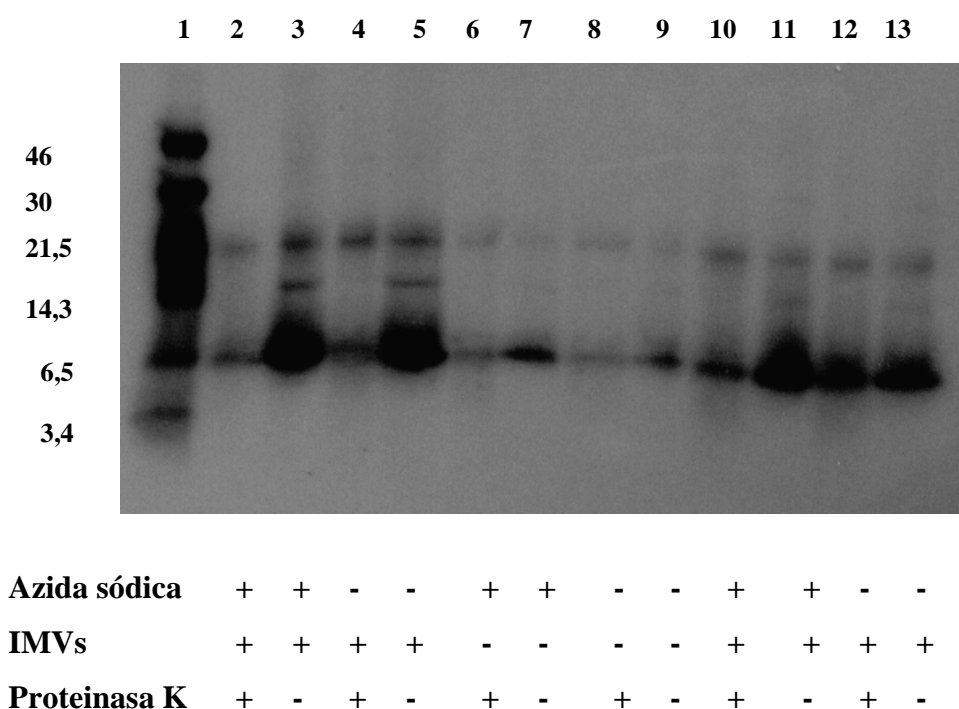
A continuación, se ensayó el proceso de translocación de la preproenterocina P empleando IMVs de células de *E. coli* que sobreexpresaban el complejo integral de membrana de la translocasa SecYEG (*E. coli* SecYEG<sup>+</sup>), junto con SecA de *E. coli* (sección VI.2.3.2). Los resultados de la reacción de translocación se muestran en la Fig. 6.4. A pesar de que el tratamiento con proteinasa K no resultó completamente eficaz frente a los agregados multiméricos de tamaño molecular elevado, la desaparición de las bandas proteicas correspondientes al prepropéptido y a su hipotético dímero, junto con la ausencia de bandas del tamaño molecular del SP, sugieren que, al igual que en el caso anterior, no se produjo la translocación ni el procesamiento del prepropéptido.



**Fig. 6.4. Ensayo de translocación *in vitro* de la preproenterocina P empleando IMVs y SecA de *E. coli* SecYEG<sup>+</sup>.** (1) Marcador de tamaño molecular; (2-7) preproenterocina P con las adiciones especificadas en la figura.

La siguiente estrategia para evaluar la translocación de la preproenterocina P mediante la ruta *sec* consistió en un ensayo de transcripción-traducción-translocación *in vitro* acopladas (sección VI.2.3.3.1) empleando IMVs de *E. coli* provistas de SecA e IMVs de *E. coli* sobreproductora de SecYEG de *B. subtilis*, junto con SecA de *B. subtilis*. En la Fig. 6.5 se observa que no se produjo procesamiento del prepropéptido en ninguno de los casos, puesto que la banda de menor tamaño molecular ( $\approx 6,5$  kDa) se corresponde aproximadamente con el tamaño del prepropéptido. El

tratamiento con proteinasa K no eliminó por completo la proteína, lo que podría sugerir que ésta se había translocado al interior de las IMVs. Sin embargo, como el control en ausencia de IMVs mostró un patrón de respuesta similar a la acción de la proteinasa K, la “resistencia” a la proteinasa K no puede considerarse indicativa de la translocación del prepropéptido.

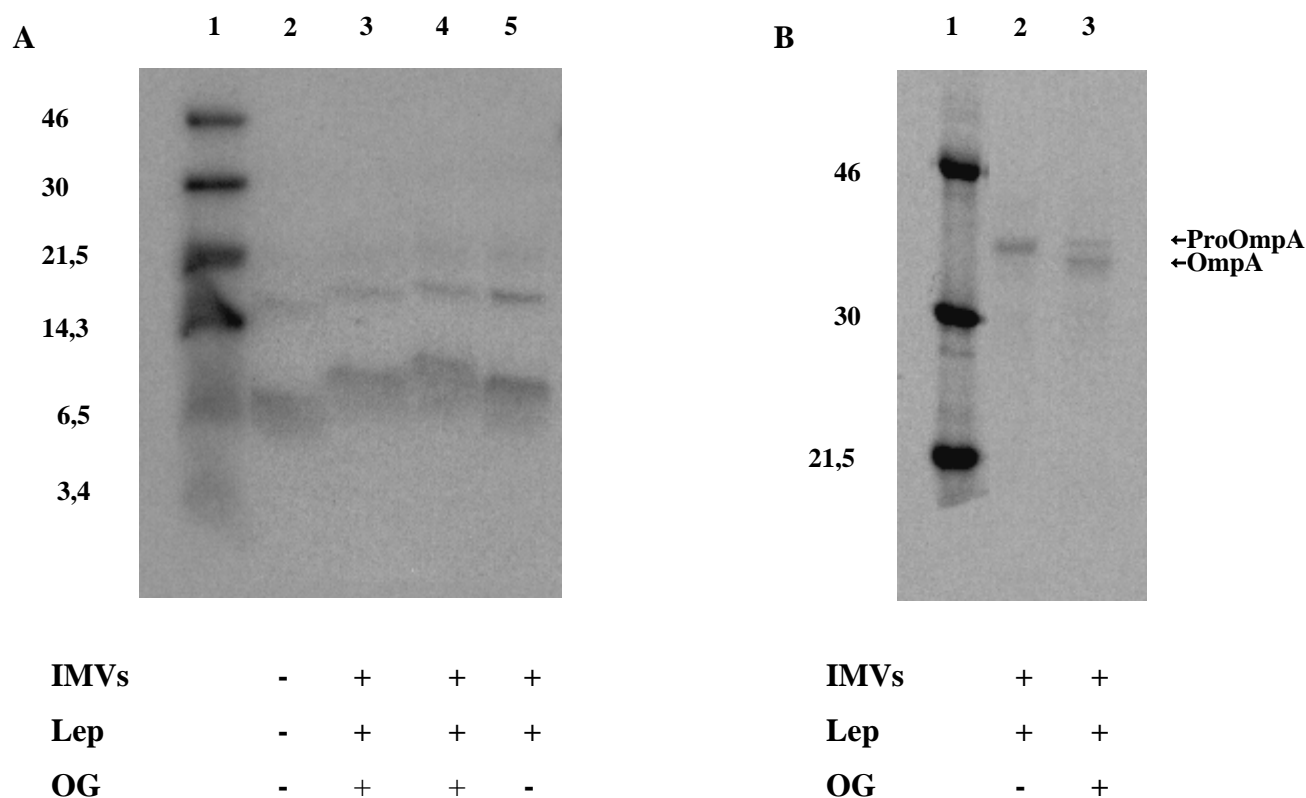


**Fig. 6.5. Ensayo de translocación acoplada a la transcripción/traducción *in vitro* de la preproenterocina P empleando SecA e IMVs de *E. coli* o SecA de *B. subtilis* e IMVs de *E. coli* que expresan SecYEG de *B. subtilis*.** (1) Marcador de tamaño molecular; (2-13) preproenterocina P con las adiciones especificadas en la figura.

### VI.3.3. ENSAYOS DEL PROCESAMIENTO *in vitro* DE LA PREPROENTEROCINA P POR LAS PEPTIDASAS LÍDER DE *E. coli* Y DE *B. subtilis*

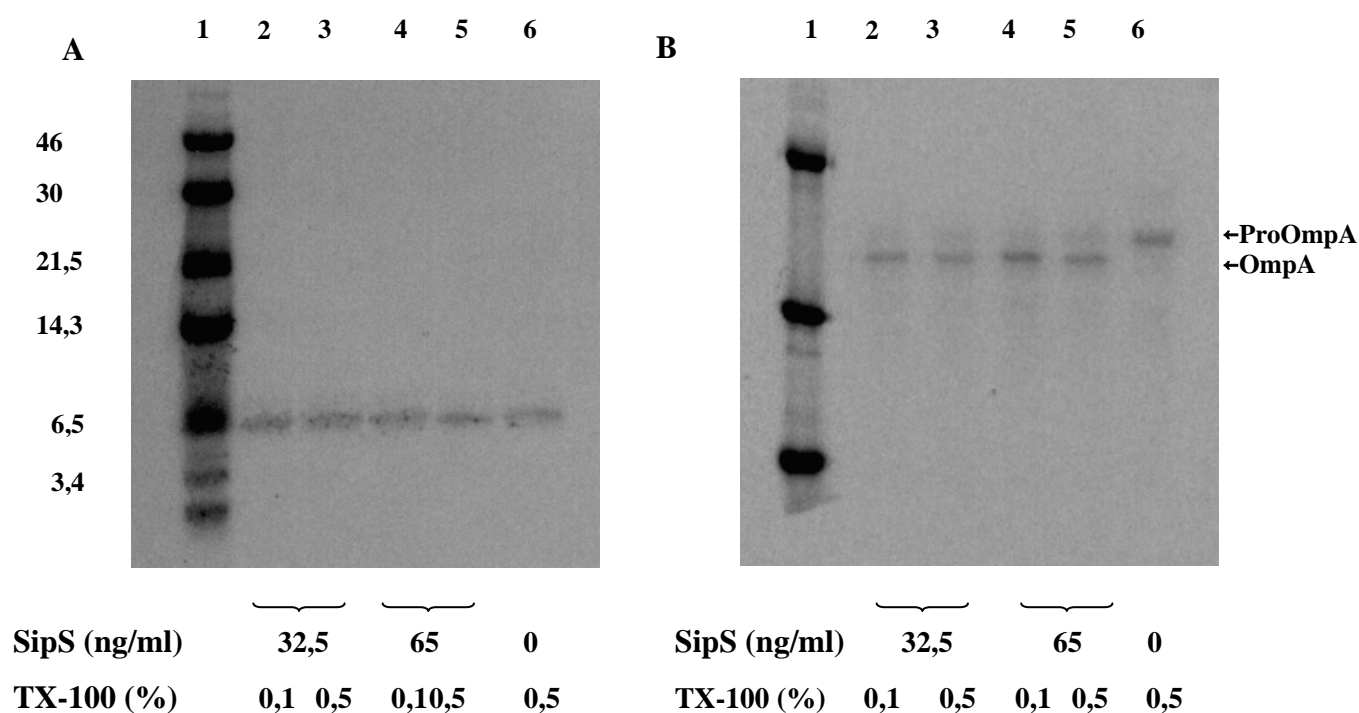
La Lep encargada del procesamiento de los precursores proteicos se encuentra en el lado interno de las IMVs del tipo *inside-out*, por lo que la ausencia de procesamiento del propéptido podría deberse únicamente a que no se translocó. Con el objeto de establecer la sensibilidad de la preproenterocina P a las peptidasas señal se emplearon dos aproximaciones distintas (sección VI.2.3.3.2). En la primera, se utilizaron IMVs de *E. coli* que sobreproducían Lep, la cual se exteriorizó mediante solubilización de las vesículas con el detergente OG. Como se refiere en la

Fig. 6.6A no se produjo el procesamiento de la preproenterocina P; en cambio, sí se observó procesamiento del control proOmpA (Fig. 6.6B), lo que indica que la peptidasa se exteriorizó correctamente.



**Fig. 6.6. Ensayo del procesamiento *in vitro* de la preproenterocina P por Lep de *E. coli*.** (A) Gel de acrilamida al 20%: (1) marcador de tamaño molecular; (2-5) preproenterocina P con las adiciones especificadas en la figura; (B) Gel de acrilamida al 12%: (1) marcador de tamaño molecular; (2-3) proOmpA con las adiciones especificadas.

Mediante la segunda estrategia, se evaluó la capacidad de la peptidasa SipS de *B. amyloliquefaciens* para procesar la preproenterocina P. Para ello, se emplearon dos concentraciones diferentes de SipS semipurificada en presencia del detergente TX-100 y, al igual que en el caso anterior, se utilizó proOmpA como control. Como se observa en la Fig. 6.7A, la preproenterocina P no fue sensible a la acción de la peptidasa; contrariamente, la Fig. 6.7B muestra que el tratamiento de proOmpA con SipS sí que produjo el procesamiento del prepéptido.



**Fig. 6.7. Ensayo del procesamiento *in vitro* de la preproenterocina P por la SipS de *B. subtilis*.**

(1) Gel de acrilamida al 20%: (1) marcador de tamaño molecular; (2-6) preproenterocina P con las adiciones especificadas en la figura; (B) Gel de acrilamida al 12%: (1) marcador de tamaño molecular; (2-6) proOmpA con las adiciones especificadas en la figura.

## VI.4. DISCUSIÓN

### VI.4.1. CARACTERÍSTICAS DEL PÉPTIDO SEÑAL DE LA ENTEROCINA P

La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se sintetizan como preprobacteriocinas con extensiones N-terminales del tipo doble glicina o SP, constituidas por 18-32 aminoácidos. La función principal de dichas extensiones es la de dirigir a los prepropéptidos hacia la maquinaria de translocación y procesamiento.

La enterocina P se sintetiza en forma de un precursor de 71 aminoácidos (7.552 Da), cuyo punto de procesamiento se sitúa inmediatamente detrás de los residuos Val-Asp-Ala de su extensión N-terminal (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998). Esta extensión N-terminal está integrada por 27 aminoácidos (2.940 Da) (Fig. 6.9) y presenta un elevado pI (11,1) y una carga neta de +3 a pH 7,0. Además, posee un marcado carácter hidrofóbico (índice GRAVY de +8,92) y una posible hélice  $\alpha$  transmembrana entre los residuos -23 y -7 (Casaus, 1998).

Casaus (1998) observó que la extensión N-terminal de la preproenterocina P muestra las características propias de los SP que dirigen la secreción de proteínas a través de la ruta *sec* (Watson, 1984; von Heijne, 1988; Izard y Kendall, 1994). Como se describió en la sección II.2.4.2.1 (capítulo II), estos péptidos constan de tres regiones con características físico-químicas bien diferenciadas. Así, el dominio N del SP de la preproenterocina P estaría integrado por los aminoácidos Met-Arg-Lys-Lys y presentaría una carga neta positiva de +3 a pH 7,0. Por otra parte, el dominio H estaría compuesto por 17 aminoácidos, la mayoría de ellos de carácter apolar (Leu, Phe, Ala, Ile, Val). La presencia de Pro o Gly en una posición central dentro del dominio H es frecuente dentro de los SP de procariotas (von Heijne, 1988). Por último, el dominio C, formado por 6 aminoácidos, se encuentra separado del H por un residuo de Gly, por lo que sigue la tendencia general observada en procariotas tanto en cuanto al tamaño (6-7 residuos), como al residuo situado en la frontera entre dominios H y C (Pro, Gly, Gln, Ser o un residuo cargado) (von Heijne, 1983). Los residuos de Pro y Gly de esta región podrían servir de transición entre los dominios H y C, para evitar el ocultamiento del sitio de corte en la membrana y asegurar su accesibilidad a Lep (von Heijne, 1988). Todos los lugares de corte de los SP se ajustan a la “regla del (-3, -1)” de von Heijne (1983). Según esta regla, las posiciones -1 y -3 relativas al sitio de corte deben estar ocupadas por un residuo pequeño y sin carga (Ala, Ser, Gly, Cys, Thr y, ocasionalmente, Gln, Pro o Leu). En procariotas, la variabilidad de la posición -1 tiene una tolerancia muy baja, admitiendo únicamente los residuos Ala, Gly o Ser (von Heijne, 1988). Contrariamente, la posición -2 suele presentar




residuos cargados (Glu o Asp en el 40% de los SP de bacterias) y de mayor tamaño molecular que los anteriores, lo que, probablemente, representa una estrategia para reducir las posibilidades de procesamiento erróneo (von Heijne, 1984). En definitiva, los SP funcionales de los procariotas presentan un diseño dipolar, con los extremos amino- y carboxi-terminal cargados positiva y negativamente, respectivamente.

En la actualidad, únicamente se conocen 5 bacteriocinas de bacterias lácticas (incluyendo la enterocina P) con extensiones N-terminales que sugieren que su transporte y procesamiento se realiza mediante la ruta *sec*: la acidocina B de *Lb. acidophilus* M46 (Leer *et al.*, 1995), la divergicina A de *Cb. divergens* LV13 (Worobo *et al.*, 1995), la bacteriocina 31 de *E. faecalis* Y1717 (Tomita *et al.*, 1996) y la lactococina 972 de *L. lactis* IPLA 972 (Martínez *et al.*, 1999). Las secuencias aminoacídicas de los SPs de las bacteriocinas *sec*-dependientes descritas hasta la fecha y el SP de la preproenterocina AS-48 se muestran en la Tabla VI.2. La enterocina AS-48, producida por *E. faecalis* S-48, se sintetiza en forma de precursor de 105 aminoácidos con un SP de 35 aminoácidos. El SP posee un residuo de histidina en la posición -1 relativa al sitio de procesamiento, lo que constituye un aminoácido “atípico” para esta posición (Martínez-Bueno *et al.*, 1994). A pesar de que la enterocina AS-48 posee una extensión N-terminal del tipo SP, la detección de los genes *as48B*, *as48C*, *as48C1* y *as48D* localizados detrás del gen estructural de la bacteriocina y posiblemente implicados en la secreción y o maduración de la bacteriocina, sugiere que ésta se secreta mediante un sistema de transporte dedicado (Martínez-Bueno *et al.*, 1998).

En general, los SP de las proteínas de procariotas, presentan características físico-químicas similares, pero carecen de homología en su secuencia primaria (von Heijne, 1988; Izard y Kendall, 1994). Sin embargo, el péptido señal de la preproenterocina P (27 aminoácidos) presenta una homología del 50% con el de la preprobacteriocina 31 (24 aminoácidos), siendo éstas las únicas bacteriocinas de la clase IIa que, presumiblemente, se transportan y procesan mediante la ruta *sec*. Por otra parte, la homología del SP de la preproenterocina P con el de los precursores de la divergicina A (29 aminoácidos) y de la acidocina B (32 aminoácidos) es, únicamente, del 26 y 22%, respectivamente. La lactococina 972 representa un caso atípico, pues su extensión N-terminal presenta algunas características típicas de un SP y otras propias de las secuencias líder del tipo doble glicina, tales como las secuencias diméricas GG (19-20) y LS (10-11) (Håvarstein *et al.*, 1994). Aunque los autores no descartan que exista un procesamiento adyacente a la secuencia doble glicina, el hipotético péptido resultante no posee actividad antimicrobiana detectable (Martínez *et*

Tabla VI.2. Secuencia del SP de las bacteriocinas sec-dependientes de las bacterias lácticas

	-35	-30	-25	-20	-15	-10	-5	-1+1	+5	
Acidocina B	M V T K Y G R N L G L S K V E L F A I W A V L V V A L L L A T A							N I Y W I	Leer <i>et al.</i> (1995)	
Divergicina A		M K K Q I L K G L V I V V C L S G A T F F S T P Q Q A S A						A A P K I	Worobo <i>et al.</i> (1995)	
Bacteriocina 31			M K K K L V I C G I I G I G F T A L G T N V E A					Y Y G N G	Tomita <i>et al.</i> (1996)	
Enterocina P			M R K K L F S L A P I G I F G L V V T N F G T K V D A					A T R S Y	Cintas <i>et al.</i> (1997)	
Lactococcina 972			M K T K S K V K A K S A V T K F S A G G I V A Q A					E G T W Q	Martínez <i>et al.</i> (1999)	
Enterocina AS-48	M V K E N K F S K I F I L M A L S F L G L A L F S A S L Q F L P I A H							M A K E F	Martínez –Bueno <i>et al.</i> (1994)	

La línea vertical discontinua indica el sitio de procesamiento de la preprobacteriocina. En negrita se indican los aminoácidos situados en las posiciones -3 y -1 con respecto al punto de procesamiento; a la derecha de éste se muestran los cinco primeros aminoácidos del extremo N-terminal del propéptido.

*al.*, 1999). Además, la producción de algunas de estas bacteriocinas parece depender de la expresión de un único operón que contiene exclusivamente el gen estructural y el de inmunidad (Leer *et al.*, 1995; Worobo *et al.*, 1995).

#### **VI.4.2. TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE LA ENTEROCINA P POR SISTEMAS *sec*-DEPENDIENTES HETERÓLOGOS**

La reacción de translocación proteica *in vitro* se reconstituye generalmente empleando ATP, SecA y SecB purificadas, la preproteína de interés en una conformación no plegada e IMVs de *E. coli* que contienen el complejo integral de membrana de la translocasa (SecYEG) y Lep (Hanada *et al.*, 1994; Manting, 1999). Los resultados de la reacción de translocación se miden indirectamente por la inaccesibilidad de las proteasas a las proteínas acumuladas en el interior de las IMVs (Lill *et al.*, 1990).

En este trabajo, con el objeto de detectar la translocación y/o el procesamiento de la preproenterocina P por las rutas *sec* de *E. coli* y *B. subtilis*, se emplearon diversas estrategias experimentales. Inicialmente, se emplearon IMVs de *E. coli* desprovistas de SecA junto con SecA pura de *E. coli*. La ausencia de translocación y procesamiento observado en estas condiciones (sección VI.3.2, Fig. 6.4) condujo al empleo de IMVs de *E. coli* que sobreexpresaban los genes del complejo SecYEG; en este sentido, van der Does *et al.* (1996) demostraron que la sobreexpresión de SecYEG estimulaba la translocación *in vitro* del precursor de *E. coli* proOmpA. A pesar de todo, tampoco se detectó la translocación de preproenterocina P en estas condiciones (sección VI.3.2, Fig. 6.5).

En los experimentos de translocación realizados en este trabajo no se empleó la chaperona SecB (sección II.2.4.2.2), ya que, además de no ser imprescindible para el proceso de translocación *in vitro* (Fekkes y Driessen, 1999), podría influir negativamente en la interacción del precursor proteico con SecA debido a su elevado tamaño molecular en comparación con el de la preproenterocina P. Para minimizar la posibilidad de que los ensayos de translocación fueran infructuosos debido a que la prebacteriocina, en ausencia de chaperonas específicas que la mantuvieran en una conformación no plegada, se encontrara en una conformación incompatible con dicho proceso, se realizaron ensayos de transcripción-traducción-translocación *in vitro* acopladas. Cuando estos ensayos se efectuaron empleando IMVs de *E. coli* y SecA de *E. coli*, no se observó translocación (sección VI.3.2, Fig. 6.6). La utilización de IMVs obtenidas a partir de células de *E. coli* que producían los componentes SecYEG de la translocasa de *B. subtilis*, junto con SecA pura

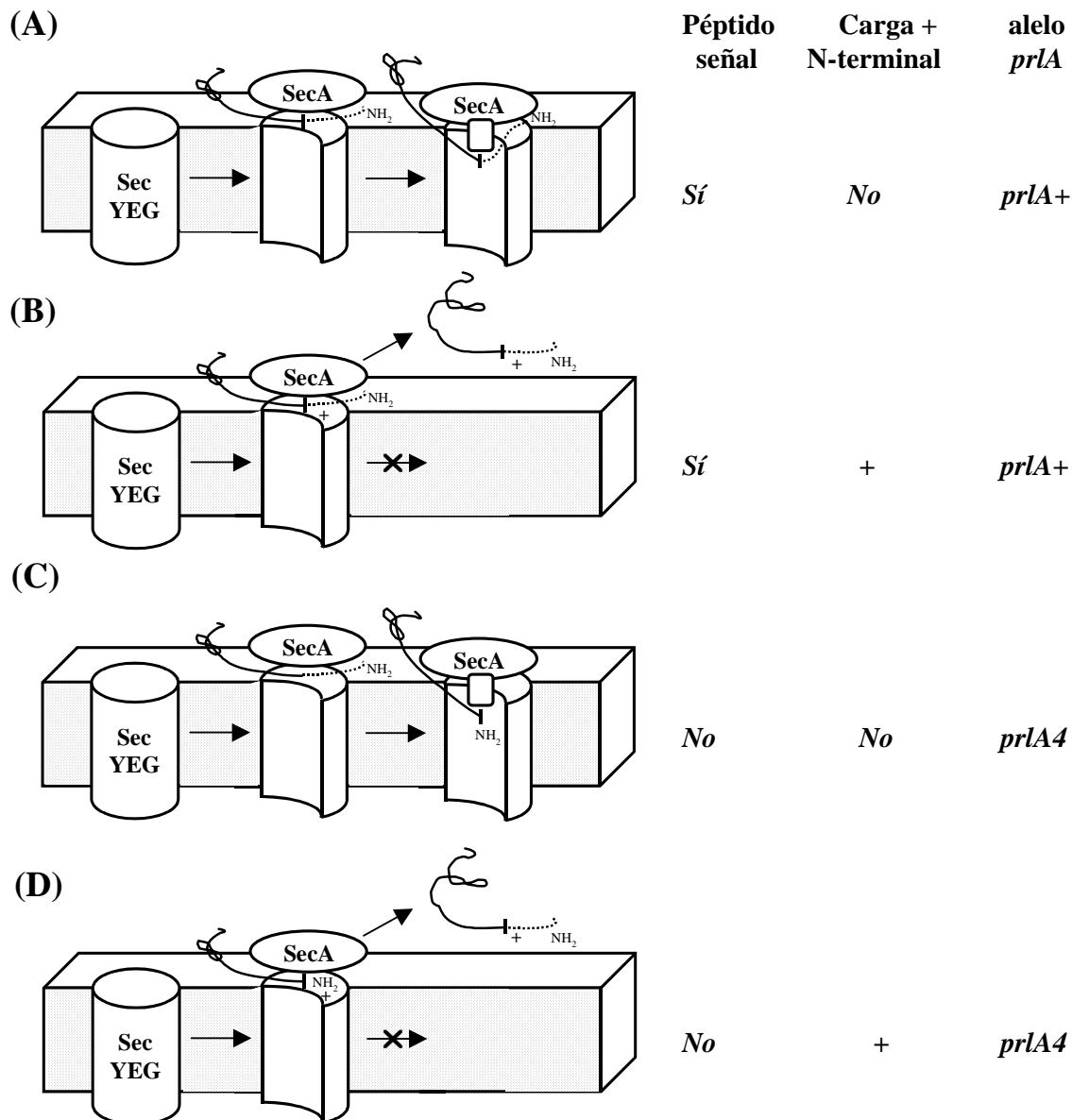
de este último microorganismo, tampoco se detectó translocación del prepropéptido al interior de las IMVs (sección VI.3.2, Fig. 6.6).

A pesar de que no se conocen con exactitud las interacciones que se establecen entre las subunidades de la translocasa en sistemas heterólogos, se ha sugerido que una o más proteínas Sec podrían actuar de manera específica en el huésped (Swaving *et al.*, 1999). En este sentido, la ineficiencia de la translocación de proOmpA, un precursor proteico de *E. coli*, en un sistema que contenía SecA y SecYEG de *B. subtilis*, pudo deberse a un reconocimiento escaso de este sustrato y/o a la débil estimulación de la actividad ATPasa de SecA tras su unión al prepéptido; asimismo, la pequeña cantidad de proteína translocada no fue procesada por la peptidasa líder de *E. coli*. Por otra parte, la translocación del precursor proteico prePhoB de *B. subtilis* tuvo lugar únicamente cuando se empleó SecA de *B. subtilis* junto con SecYEG de esta especie y, en menor medida, SecA y SecYEG de *E. coli* (Swaving *et al.*, 1999). Por lo tanto, es posible que las subunidades de la translocasa contribuyan de manera exclusiva a la especificidad y funcionalidad del complejo y no puedan ser intercambiadas incondicionalmente, a pesar de las homologías existentes entre componentes homónimos de distintas especies; así, por ejemplo, SecY y SecA de *B. subtilis* presentan una identidad con SecY y SecA de *E. coli* del 50 y 41%, respectivamente (Suh *et al.*, 1990; Sadaie *et al.*, 1991). Además, es posible que los distintos precursores proteicos difieran en su dependencia de las subunidades de la translocasa (Swaving *et al.*, 1999).

Diversos investigadores han señalado la posibilidad de que las proteínas que se secretan contengan en su región madura secuencias que contribuyan a dirigir su transporte al exterior del citoplasma (Li *et al.*, 1988; Prinz *et al.*, 1996). En este sentido, el aislamiento de mutantes capaces de transportar proteínas con SPs defectuosos permite profundizar en el conocimiento de las interacciones entre las proteínas de la maquinaria de transporte y las distintas regiones de la preproteína. Los mutantes *prl* (del inglés, *protein localization*) poseen esta capacidad y se han detectado para la mayoría de los genes *sec*, incluyendo *secY*, *secA*, *secE* y *secG* (Bieker *et al.*, 1990; Schatz y Beckwith, 1990); una posible explicación de su funcionamiento es la alteración de la actividad lectora de prueba que impide la entrada de proteínas con SPs alterados en la maquinaria de secreción (Osborne y Silhavy, 1993). Los mutantes *prlA* y *prlA4* (una mutación *prlA* fuerte), con mutaciones en *secY*, pueden incluso transportar proteínas que carecen de SP (Derman *et al.*, 1993). En un estudio realizado con mutantes de fosfatasa alcalina y amilasa de *E. coli* carentes de SP se observó que la introducción de una o dos cargas positivas en su región N-terminal, producía el bloqueo de su transporte en un mutante *prlA4* de *E. coli* (Prinz *et al.*, 1996). La introducción de aminoácidos básicos en proteínas que poseen un SP producen resultados similares (Li *et al.*, 1988).

El modelo propuesto por Prinz *et al.* (1996) para explicar el bloqueo en la translocación producido por los aminoácidos básicos presentes en la región N-terminal de la proteína madura se muestra en la Fig. 6.8. Una vez que las proteínas se sitúan en el lugar de reconocimiento de la maquinaria de translocación (probablemente SecYEG y SecA) se produce la actividad lectora de prueba; en caso de que sea exitosa, tiene lugar un cambio conformacional que permite la iniciación del proceso de translocación. En preproteínas con un SP funcional, la región C-terminal del SP y la N-terminal de la proteína madura pueden atravesar la membrana y formar un bucle, quedando la preproteína insertada en la membrana junto con SecA (Fig. 6.8A y C). Sin embargo, si la proteína presenta una carga neta positiva en la región N-terminal del péptido maduro, sufre un rechazo por parte de la maquinaria de translocación y es incapaz de entrar en la membrana (Figs. 6.8B y D). En este sentido, Izard y Kendall (1994) hipotetizaron que una carga positiva en la región N-terminal del péptido maduro podría alterar la naturaleza dipolar del SP, o bien, competir con la región N-terminal del SP e impedir alguna interacción electrostática importante. En relación al carácter dipolar (von Heijne, 1986), es posible que la PMF de la membrana interna de los procariotas facilite la inserción de SPs con esta distribución de cargas (Boyd y Beckwith, 1990; Driessen, 1992; Cao *et al.*, 1995), favoreciendo el transporte de residuos con carga negativa y dificultando el de residuos con carga positiva. Este fenómeno estaría de acuerdo con la “regla del interior positivo” (von Heijne, 1986), que predice la disposición de las secuencias hidrofóbicas en la membrana con su región cargada positivamente orientada hacia el citoplasma. Por otra parte, puesto que las cargas positivas de la región N-terminal de los SP interaccionan de manera electrostática con los fosfolípidos con carga negativa de la membrana, con SecA y con las cargas negativas cercanas al sitio de procesamiento para formar un bucle que atraviese la membrana (de Vrije *et al.*, 1990), la presencia de cargas positivas en el péptido maduro cercanas al SP podría interferir con dichas interacciones y bloquear la translocación.

En resumen, las causas principales de la ausencia de translocación *in vitro* de la preproenterocina P observada en este trabajo podrían ser el escaso reconocimiento de este sustrato por los componentes de los sistemas *sec* heterólogos, o la presencia de una carga positiva en los primeros residuos del péptido maduro. El hecho de que la bacteriocina madura se haya purificado de los sobrenadantes de cultivos de *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998) indica que, *in vivo*, se produce la translocación y el procesamiento de la preproenterocina P por la maquinaria de translocación de *E. faecium* P13.



**Fig. 6.8. Modelo para la iniciación de la translocación proteica.** En la preproteína se representa el SP con una línea discontinua y la región madura con una línea continua. (A) El SP de la preproteína se sitúa en el sitio de reconocimiento de SecA y produce un cambio conformacional en SecYEG. A continuación, la región C-terminal del SP y la región N-terminal de la porción madura se insertan mediante un bucle en SecYEG. (B) Cuando existe un residuo aminoacídico con carga positiva inmediatamente detrás del sitio de corte del SP, el segundo paso del proceso de iniciación de la translocación está bloqueado. (C) Cuando una preproteína sin SP se dirige a la maquinaria de translocación de un mutante *prlA4*, se produce un cambio conformacional en SecYEG y la entrada de la preproteína en la maquinaria de secreción. (D) Cuando existe un residuo aminoacídico con carga positiva en la región N-terminal de una proteína sin SP se bloquea el segundo paso del proceso de iniciación de la translocación. Fuente: Prinz *et al.* (1996).

Las diferencias observadas en los modelos *in vitro* podrían deberse a la variabilidad del efecto de los aminoácidos básicos en función del sistema estudiado (Boyd y Beckwith, 1990), o bien a que la PMF y otros componentes del sistema de translocación pueden contribuir *in vivo* al transporte de la proteína (Swaving *et al.*, 1999).

Aunque en determinadas condiciones es posible observar translocación no acoplada al procesamiento del precursor proteico (van Dijl *et al.*, 1992; Swaving *et al.*, 1999), el procesamiento del péptido señal en IMVs del tipo *inside-out* únicamente podría suceder si existiera una translocación previa que expusiera el péptido señal al sitio catalítico de Lep. Por este motivo, se emplearon dos aproximaciones distintas para estudiar el procesamiento de la preproenterocina P. En la primera, se solubilizó la peptidasa líder de *E. coli* mediante tratamiento de las IMVs con el detergente octilglucósido; en la segunda, se utilizó SipS de *B. amyloliquefaciens* que presenta claras similitudes estructurales con la de *E. coli*, a pesar de su menor tamaño (183 y 323 aminoácidos, respectivamente) (van Dijl *et al.*, 1992). Sin embargo, aunque ambas peptidasas procesaron el precursor proOmpA, no se observó procesamiento de la preproenterocina P (sección VI.3.2., Figs. 6.6 y 6.7).

En general, se ha observado que los SPs de las bacterias Gram-positivas pueden ser procesados por la Lep de *E. coli* (Smith *et al.*, 1987); no obstante, existen casos en los que éstos deben ser procesados específicamente por la peptidasa señal de las bacterias Gram-positivas (van Dijl, 1990). Puesto que los dominios N y H del SP no son necesarios para el procesamiento (Dev *et al.*, 1990), la ausencia de este proceso podría deberse a las características del dominio C o a las del inicio del péptido maduro. A este respecto, como se ha indicado en la sección anterior, la región C terminal del SP de la enterocina P reúne, en principio, las características adecuadas para ser procesada por la peptidasa líder de *E. coli*, siendo los aminoácidos en posición -3, -1 (Val-Asp-Ala) muy similares a los de ProOmpA (Ala-Gln-Ala). No obstante, el extremo N-terminal del péptido maduro presenta una carga positiva en la posición +3 (Arg), que podría influir negativamente en su procesamiento. El hecho de que no se produjera procesamiento de la preproenterocina P por SipS, cuya especificidad no difiere de la Lep de *E. coli* (Simonen y Palva, 1983), es más difícil de explicar, puesto que en las bacterias Gram-positivas no existe restricción en la secuencia de la región N-terminal del péptido maduro y, por ejemplo, la SipS de *B. amyloliquefaciens* tolera una gran variabilidad de aminoácidos (independientemente de su carga) en la posición +1 (Borchert y Nagarajan, 1991). Por lo tanto, la ausencia de procesamiento podría deberse a que la preproenterocina tenga un tamaño molecular inferior al necesario para estimular una interacción productiva con la peptidasa, a que presente una conformación que oculte el sitio de corte a la acción

de las peptidasas, a la necesidad de una peptidasa específica o a otras razones todavía no esclarecidas.

#### VI.4.3. IMPLICACIONES DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE EN LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS

En general, el empleo de las bacteriocinas como bioconservantes en la industria alimentaria presenta una serie de limitaciones, como el estrecho espectro antimicrobiano de algunas de ellas, su bajo o inestable nivel de producción y/o la incapacidad del microorganismo productor para desarrollarse en los alimentos en los que la producción de una bacteriocina determinada sería especialmente útil (Abee *et al.*, 1995). La manipulación genética ofrece la posibilidad de paliar algunas de estas desventajas mediante el desarrollo de variantes con propiedades mejoradas (Dodd *et al.*, 1996) o la transferencia de los genes de biosíntesis de las bacteriocinas a otras especies o cepas de interés (Allison *et al.*, 1995; Chikindas *et al.*, 1995a; van Belkum *et al.*, 1997; Horn *et al.*, 1998, 1999).

En función del sistema de transporte y procesamiento, existen dos estrategias para la producción heteróloga de bacteriocinas: (i) el empleo de transportadores dedicados del tipo ABC; y (ii) el empleo de SPs reconocidos por los sistemas *sec*. En el primer caso, las células del hospedador de interés se pueden transformar con vectores que contengan todos los genes necesarios para la biosíntesis de una bacteriocina. Generalmente, entre estos genes se incluyen los que codifican el sistema de transporte y procesamiento (Chikindas *et al.*, 1995a; van Belkum y Stiles, 1995; Biet *et al.*, 1999; Buyong *et al.*, 1998; O'Keeffe *et al.*, 1999), pero, en ocasiones, se aprovecha la circunstancia de que la cepa hospedadora contiene genes análogos a los de transporte y procesado (Martínez *et al.*, 2000). Sin embargo, un procedimiento que ha suscitado gran interés en los últimos años se basa en las homologías existentes en las secuencias aminoacídicas de las secuencias líder de la mayoría de las bacteriocinas de la clase II, incluyendo la colicina V de *E. coli*, y de algunos lantibióticos (Håvarstein *et al.*, 1994, 1995a; Allison *et al.*, 1995; Frémaux *et al.*, 1995; Venema *et al.*, 1995). Para aprovechar las ventajas que confieren dichas homologías, se puede recurrir a la construcción de genes híbridos mediante la fusión en un mismo marco de lectura de las secuencias que codifican, por una parte, una secuencia líder reconocida por los transportadores de la célula hospedadora y, por otra, la probacteriocina de interés (van Belkum *et al.*, 1997; Horn *et al.*, 1998, 1999). Mediante estas estrategias se pueden obtener cepas con un nivel de producción heteróloga de bacteriocinas similar al de la cepa parental (Horn *et al.*, 1999), e incluso cepas coproductoras de



diversas bacteriocinas, como lactacina F y carnobacteriocinas A, BM1 y B2 (Allison *et al.*, 1995), pediocina PA-1 y lactococina A (Chikindas *et al.*, 1995a), pediocina PA-1 y nisina (Horn *et al.*, 1999) y pediocina PA-1 y enterocina A (Martínez *et al.*, 2000).

No obstante, la producción óptima de múltiples bacteriocinas por un único organismo hospedador puede requerir la presencia de varios genes estructurales, de inmunidad, o incluso de secreción, ya que las secuencias líder de los sistemas ABC no son universalmente intercambiables y la eficiencia del proceso varía considerablemente dependiendo de la bacteriocina secretada y de los transportadores empleados (Saucier *et al.*, 1995). En este sentido, las bacteriocinas *sec*-dependientes, que se transportan mediante las proteínas Sec y se procesan por una peptidasa señal ubicua en las bacterias y organismos eucarióticos, requerirían una menor cantidad de material genético para su producción y podrían, en principio, ser sintetizadas en cualquier hospedador (Leer *et al.*, 1995; Worobo *et al.*, 1995). Además, la producción heteróloga de algunas bacteriocinas empleando para su transporte y procesamiento la ruta *sec* podría ser una alternativa atractiva para las bacteriocinas procesadas y transportadas en las cepas parentales por sistemas ABC. Para ello es necesario construir genes quiméricos que codifiquen una fusión entre un SP y una probacteriocina de interés. De hecho, esta aproximación ha permitido la producción heteróloga de las bacteriocinas carnobacteriocina B2 (McCormick *et al.*, 1996), colicina V (McCormick *et al.*, 1999), enterocina B (Franz *et al.*, 1999) y de la proteína quimérica MBP-pediocina PA-1 (Miller *et al.*, 1998)

En la actualidad no se ha determinado por qué algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas poseen un sistema de transporte dedicado, ya que con un SP adecuado podrían acceder a la ruta *sec*. Las bacteriocinas podrían emplear sistemas de transporte dedicados porque pueden resultar más eficientes para las células productoras, como sugieren los resultados obtenidos por McCormick *et al.* (1996) y Biet *et al.* (1998), en estudios en los que comparaban la eficiencia de la producción heteróloga de carnobacteriocina B2 y mesentericina Y105, respectivamente, empleando un sistema de transporte dedicado o la ruta *sec*. Sin embargo, la comparación entre ambos sistemas es difícil, ya que la variabilidad observada puede depender de otros factores, como las células hospedadoras, el número de copias del plásmido de expresión y/o la eficiencia de los promotores empleados en cada caso. Además, en algunos casos, es posible que ciertas bacteriocinas no puedan acceder a la ruta *sec* debido a sus propiedades físico-químicas en general, y a la carga neta de su extremo N-terminal en particular, tal y como se ha observado en otras proteínas (McCormick *et al.*, 1996)

En cualquier caso, la disponibilidad de sistemas de producción heteróloga de bacteriocinas que empleen transportadores del tipo ABC, en unos casos, y la ruta *sec*, en otros, ampliaría las posibilidades de obtener cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas de interés

tecnológico. De hecho, en un futuro próximo, es muy probable que ambos sistemas puedan incluso explotarse de forma complementaria en una misma célula.

## *CAPÍTULO VII*

### *CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS*



**PRIMERA.** *Enterococcus faecium* AA13 y *Enterococcus faecium* G16, dos cepas bacteriocinogénicas aisladas de diferentes embutidos crudos curados españoles, producen la enterocina P, una bacteriocina *sec*-dependiente de la familia de la pediocina, y *Enterococcus faecium* P21, del mismo origen que las cepas anteriores, produce las enterocinas A y B.

**SEGUNDA.** La organización de los genes estructural, de inmunidad y del factor de inducción del operón de la enterocina A de *Enterococcus faecium* P21 es similar a la descrita en *Enterococcus faecium* DPC1146 y diferente a la de *Enterococcus faecium* CTC492.

**TERCERA.** *Enterococcus faecium* P13 se desarrolla y produce enterocina P en caldo MRS a 32°C en un fermentador bajo condiciones controladas de temperatura, presión parcial de oxígeno y agitación en el intervalo de pH comprendido entre 4,7 y 8,5. La actividad antimicrobiana máxima se obtiene a pH 6,0 y representa un incremento de cuatro veces con respecto a la del cultivo desarrollado sin control externo del pH. La tasa de disminución de la actividad antimicrobiana observado una aumenta con el pH y es máxima a pH 7,0.

**CUARTA.** La actividad antimicrobiana total y la actividad antimicrobiana específica de *Enterococcus faecium* P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C en presencia de concentraciones de sal o etanol comprendidas entre 0,5 y 5% (p/v) y 0,5% y 6% (v/v), respectivamente, es menor que la obtenida en ausencia de estos compuestos.

**QUINTA.** La enterocina P ejerce una acción bactericida no bacteriolítica frente al microorganismo sensible *Enterococcus faecium* T136. Desde un punto de vista molecular, la enterocina P produce la disminución de la concentración de ATP intracelular sin un aumento concomitante del ATP extracelular, así como la disipación selectiva del potencial de membrana de la fuerza protón motriz sin afectar a su gradiente de pH.

**SEXTA.** La enterocina P induce el movimiento transmembrana selectivo de cationes  $K^+$  sin afectar al transporte de los aniones fosfato y glutamato.

**SÉPTIMA.** La enterocina P altera la permeabilidad de liposomas derivados de *Enterococcus faecium* T136 de manera concentración- y tiempo-dependiente y es inactiva frente a liposomas

sintéticos compuestos de dioleil-glicero-fosfatidilglicerol (DOPG) y dioleil-glicero-fosfatidilcolina (DOPC).

**OCTAVA.** Los sistemas generales de secreción de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* resultaron ineficaces para el transporte y procesamiento de la preproenterocina P en sistemas experimentales basados en el empleo de vesículas de la membrana interna de *Escherichia coli*.

**FIRST.** *Enterococcus faecium* AA13 and *Enterococcus faecium* G16, two bacteriocinogenic strains isolated from different Spanish dry-fermented sausages, produce enterocin P, a *sec*-dependent pediocin-like bacteriocin, and *Enterococcus faecium* P21, isolated from the same source, produces enterocins A and B.

**SECOND.** The organization of the structural, immunity and induction factor genes in the enterocin A operon from *Enterococcus faecium* P21 is similar to that described in *Enterococcus faecium* DPC1146 and different to that of *Enterococcus faecium* CTC492.

**THIRD.** *Enterococcus faecium* P13 grows and produces enterocin P in MRS broth at 32°C in a fermentor under controlled conditions of temperature, partial O<sub>2</sub> pressure and agitation in the pH range between 4.7 and 8.5. The maximal antimicrobial activity is obtained at pH 6.0 and represents a four-fold increase compared with that of the culture grown without pH external control. The rate of antimicrobial activity decrease raises with pH and is maximum at pH 7.0.

**FOURTH.** The total antimicrobial activity and the specific antimicrobial activity of an *Enterococcus faecium* P13 culture grown in MRS broth at 32°C in the presence of salt and ethanol concentrations ranging from 0.5 to 5% (wt/v), and from 0.5 to 6% (v/v), respectively, is lower than that obtained in the absence of these compounds.

**FIFTH.** Enterocin P exerts a non-lytic bactericidal action on the sensitive microorganism *Enterococcus faecium* T136. From a molecular point of view, enterocin P produces a decrease in the intracellular ATP concentration without a concomitant increase in extracellular ATP, and the selective dissipation of the membrane potential of the proton motive force without affecting its pH gradient.

**SIXTH.** Enterocin P induces the selective transmembrane movement of K<sup>+</sup> cations without affecting the transport of phosphate and glutamate anions.

**SEVENTH.** Enterocin P alters the permeability of *Enterococcus faecium* T136-derived liposomes in a concentration and time-dependent manner and it is inactive in synthetic liposomes composed of dioleoyl-glycero-phosphoglycerol and dioleoyl-glycero-phosphocholine.

**EIGHTH.** The general secretion systems of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were ineffective in the transport and processing of preproenterocin P in experimental systems based on inner membrane vesicles of *Escherichia coli*.



## *CAPÍTULO VIII*

### *TRABAJO FUTURO*



El empleo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas como bioconservantes de los alimentos representa una alternativa interesante a la utilización de conservantes químicos potencialmente peligrosos para la salud de los consumidores o de tratamientos tecnológicos que reduzcan la calidad organoléptica y/o nutricional de los alimentos. Sin embargo, la eficacia de las bacteriocinas para controlar el desarrollo de microorganismos patógenos y/o alterantes de los alimentos podría verse comprometida por la aparición de microorganismos resistentes. Una de las estrategias propuestas para contrarrestar el desarrollo de estas resistencias consistiría en el empleo de cepas productoras de múltiples bacteriocinas o en la utilización directa de mezclas de varias bacteriocinas que actuaran mediante mecanismos de acción diferentes, de manera que las células resistentes a la acción de una bacteriocina continuaran siendo sensibles a la de las otras.

La obtención de cepas multiproductoras de bacteriocinas implica generalmente la clonación del gen estructural y de inmunidad de la bacteriocina, y, en algunos casos, de los genes de transporte y procesamiento, en el hospedador de interés. Sin embargo, las extensiones N-terminales del tipo péptido señal que poseen algunas bacteriocinas, y que posibilitan su secreción mediante la Ruta General de Secreción, permitirían, en principio, su producción heteróloga (y la de otras bacteriocinas) en cualquier hospedador. En este sentido, sería interesante clonar el gen estructural y de la inmunidad de la enterocina P, una bacteriocina *sec*-dependiente, en *E. coli* y en hospedadores de grado alimentario, y determinar si su secreción se efectúa mediante las rutas generales de secreción heterólogas. También podrían realizarse fusiones génicas entre secuencias que codifican, por una parte, el péptido señal de la enterocina P, y, por otra, probacteriocinas secretadas mediante un sistema de transporte dedicado, y evaluar la eficacia de dicha extensión N-terminal para dirigir su secreción.

Por otra parte, el hecho de que el factor limitante en la producción heteróloga de muchas proteínas sea su secreción pone de manifiesto la importancia del estudio del sistema de transporte de las bacteriocinas. En este sentido, el esclarecimiento de la influencia del tipo y de la posición de los aminoácidos, tanto en el péptido señal como en la probacteriocina, podría aportar información acerca de las combinaciones más adecuadas entre ambos elementos. En definitiva, el estudio de los mecanismos de secreción de las bacteriocinas, especialmente de las que se procesan y transportan por la Ruta General de Secreción, constituye un trabajo futuro de indudable interés científico y aplicado.



## *CAPÍTULO IX*

### *BIBLIOGRAFÍA*



## BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, I.M., T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson y I. Storrø (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 159-166.
- Abee, T., T.R. Klaenhammer y L. Letellier (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus jhonsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1006-1013.
- Abee, T., L. Krockel y C. Hill (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, 28: 169-185.
- Adams, M.R. y C.J. Halls (1988). Growth inhibition of foodborne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food. Sci. Technol.*, 23: 287-292.
- Adams, M.R. y P. Marteau (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food. Microbiol.*, 27: 263-264.
- Aguirre, M. y M. D. Collins (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 95-107.
- Akimaru, J., S.-I. Matsuyama, H. Tokuda y S. Mizushima (1991). Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6545-6549.
- Akita, M., S. Sasaki, S. Matsuyama y S. Mizushima (1990). SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 265: 8164-8169.
- Ali, D., Lacroix, C., Thuault, D., Bourgeois, C.M. y Simard, R.E. (1995). Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* UL720. *Can. J. Microbiol.*, 41: 832-841.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaumffer, J.Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402.
- Allison, G., C. Fremaux, C. Ahn y T.R. Klaenhammer (1994). Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.*, 176: 2235-2241.

- Allison, G.E.R., R.W. Worobo, M.E. Stiles y T.R. Klaenhammer (1995). Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1371-1377.
- Anderssen, E.L., D.B. Diep, I.F. Nes, V.G.H. Eijsink y J. Nissen-Meyer (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2269-2272.
- Anderson, D.G. y L.L. McKay (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:549-552
- Appel, R.D., A. Bairoch, y D.F. Hochstrasser (1994). A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19:258-260.
- Arihara, K., R.G. Cassens y J.B. Luchansky (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 19: 123-134.
- Arkowitz, R.A. y W. Wickner (1994). SecD and SecF are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. *EMBO J.*, 13: 954-963.
- Audisio, M.C., G. Oliver y M.C. Apella (1999). Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp. *J. Food Prot.*, 62: 751-755.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En "*Lactic Acid Bacteria*", pp. 1-72. Salminen, S. y A. Von Wright (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Axelsson, L.T., T.C. Chung, W.J. Dobrogosz y S. Lindgren (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health. Dis.*, 2: 131-136.
- Axelsson, L., A. Holck, S.E. Birekland, T. Aukrust y H. Bloom (1993). Cloning and nucleotide sequence of a gene from *Lactobacillus sake* Lb706 necessary for sakacin A production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:2868-2875.
- Axelsson, L. y A. Holck (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.*, 177: 2125-2137.
- Aymerich, T. (1996). Caracterización bioquímica y genética de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos fermentado-curados. Técnicas de transferencia genética. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.



- Aymerich, T., H. Holo, L.S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga e IF. Nes (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Env. Microbiol.*, 62: 1676-1682.
- Aymerich, M.T y M. Hugas (1998a). Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, 72: 39-49.
- Aymerich, M.T., M. Hugas y J.M. Monfort (1998b). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Sci. Technol. Int.*, 4: 141-158.
- Aymerich, M.T., M. Garriga, J.M. Monfort, I.F. Nes y M. Hugas (2000a). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiol.*, 17: 33-45.
- Aymerich M.T., M.G. Artigas, M. Garriga, J.M. Monfort y M. Hugas (2000b). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 686-694.
- Aymerich, M.T., M. Garriga, J. Ylla, J. Vallier, J.M. Monfort y M. Hugas (2000c). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63: 721-726.
- Bakker, E.P y W.E. Mangerich (1981). Interconversion of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.*, 147: 820-826.
- Baneyx, F y G. Georgiou (1990). In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol.*, 172: 491-494.
- Baranyi, J. y T.A. Roberts (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 277-294.
- Baranyi, J. y T.A. Roberts (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 26: 199-218.
- Bárcena, J.M.B., F. Siñeriz, D. González de Llano, A. Rodríguez y J.E. Suárez (1998). Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL441. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3512-3514.
- Barefoot, S. y T.R. Klaenhammer (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26:328-334.

- Barefoot, S.F., Y.-R. Chen, T.A. Hughes, A.B. Bodine, M.Y. Shearer y M.D Hughes (1994). Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 3522-3528.
- Barrena-González, C., E. Huot y H. Petitdemange (1996). Mode of action of a bacteriocin (J46) produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *J. Food Prot.*, 59: 955-962.
- Batzri, S y E.D. Korn (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* 298: 1015-1019.
- Bechinger, B. (1997). Structure and function of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membr. Biol.*, 156: 197-211.
- Bechinger, B. (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 157-183.
- Ben Embarek, P.K., V. From Jeppesen y H.H. Hus (1994). Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* isolated from *sous-vide* cooked fish filletes. *Food Microbiol.*, 11: 525-536.
- Bennik, M.H.J., E.J. Smid y L.G.M. Gorris (1997a). Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2074-2076.
- Bennik, M.H.J., A. Verheul, T. Abee, G. Naaktgeboren-Stoffels, L.G.M. Gorris y E.J. Smid (1997b). Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3628-3636.
- Bennik, M.H.J., B. Vanloo, R. Brasseur, L.G.M. Gorris y E.J. Smid (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1373: 47-58.
- Betzl, D., D. Ludwig y K.H. Schleifer. (1990). Identification of lactococci and enterococci by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6: 2927-2929.
- Bhunia, A.K., M.C. Johnson y B. Ray (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 261-268.
- Bhunia, A.K., M.C. Johnson, B. Ray y N. Kalchayanand (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 25-33.

- Bibal, B., G. Goma, Y. Vayssier y A. Pareilleux (1988). Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 340-344.
- Bieker, K.L., G.J. Philips y T.J. Silhavy (1990). The *sec* and *prl* genes of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22: 291-310.
- Biet, F., J.M. Berjeaud, R.W. Worobo, Y. Cenatiempo y C. Fremaux (1998). Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretory pathway. *Microbiology*, 144: 2845-2854.
- Birnboim H.C. y J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- Biswas, S.R., P. Ray, M.C. Johnson y B. Ray (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1265-1267.
- Blondelle, S.E., K. Lohner y M.I. Aguilar (1999). Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 89-108.
- Blom, H., T. Katla, B.F. Hagen, y L. Axelsson (1997). A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, 38: 103-109.
- Blom, H., T. Katla, A. Holck, K. Sletten, L. Axelsson y H. Holo. (1999). Characterization, production and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Current Microbiol.*, 39: 43-48.
- Bojovic-Matijasic, B., I. Rogelj, I.F. Nes y H. Holo (1998). Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49: 606-612.
- Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 13:61-92.
- Borchert, T.V. y V. Nagarajan (1991). Effect of signal sequence alterations on export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173: 276-282.
- Boyce, J.M., S. M. Opal, G. Potter-Bynoe, R.G. LaForge, M.J. Zervos, G. Furtado, G. Victor y A. A. Meideros (1992). Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistan enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36: 1032-1039.

Boyd, D y J. Beckwith (1990). The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell*, 62: 1031-1033.

Breukink, E., C. van Kraaij, R.A. Demel, R.J. Siezen, O.P. Kuipers y B. den Kruijff (1997). The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*, 36: 6968-6976.

Breukink, E., C. van Kraaij, A. van Dalen, R.A. Demel, R.J. Siezen, B. den Kruijff y O.P. Kuipers (1998). The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry*, 37: 8153-8162.

Breukink, E. y B. den Kruijff (1999). The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 223-234.

Brötz, H., M. Josten, I. Wiedmann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum y H.-G. Sahl (1998). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.*, 30: 317-327.

Brurberg, M.B., I.F. Nes y V.G.H. Eijsink (1997). Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.*, 26: 347-360.

Bruno, M.E.C., A. Kaiser y T.J. Montville (1992). Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2255-2259.

Bruno, M.E.C. y T.J. Montville (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3003-3010.

Buyong, N., J. Kok y J.B. Luchansky (1998). Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* en Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4842-4845.

Callewaert, R., H. Holo, B. Devreese, J. van Beeumen, I.F. Nes y L. De Vuyst (1999). Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method. *Microbiology*, 145: 2559-2568.

Callewaert, R., M. Hugas y L. De Vuyst (2000). Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 57: 33-42.

Cao, G., A. Huhn y R.E. Dalbey (1995). The translocation of negatively charged across the membrane is driven by the electrochemical potential: evidence for an electrophoresis-like transfer mechanism. *EMBO J.*, 14: 866-875.

Carolissen-Mackay, V., G. Arendse y J.W. Hastings (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.*, 34: 1-16.

Casaus, M.P. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Casaus, M.P., T. Nilsen, L.M. Cintas, I.F. Nes, P.E. Hernández y H. Holo (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287-2294.

Cintas, L. M. (1995). Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Cintas, L.M., J.M. Rodríguez, M.F. Fernández, K. Sletten, I.F. Nes, P.E. Hernández y H. Holo (1995). Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643-2648.

Cintas, L.M., P. Casaus, L.S. Håvarstein, P.E. Hernández y I.F. Nes (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321-4330.

Cintas, L.M., P. Casaus, M.F. Fernández y P.E. Hernández (1998a). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, 15: 289-298.

Cintas, L.M., P. Casaus, H. Holo, P.E. Hernández, I.F. Nes y L.S. Håvarstein (1998b). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988-1994.

Cintas, L.M. y P. Casaus (1998c). La necesidad de conservar los alimentos. Bioconservación. *Alim. Equip. Tecnol.*, diciembre: 89-95.

Cintas, L.M., P. Casaus y P.E. Hernández (2000a). Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I). Ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno y productos finales del catabolismo. *Alim. Equip. Tecnol.*, julio-agosto: 83-90.

Cintas, L.M., P. Casaus, C. Herranz, H. Holo, P.E. Hernández, I.F. Nes y L.S. Håvarstein (2000b). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and

L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* (en prensa)

Cintas, L.M., M.P. Casaus, C. Herranz, I.F. Nes y P.E. Hernández (2000c). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* (enviado).

Cintas, L.M., P. Casaus y P.E. Hernández (2000d). Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria* (enviado).

Clewell, D.B. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 90-102.

Contreras, B.G.L., L. de Vuyst, B. Devreese, K. Busanyova, J. Raymaeckers, F. Bosman, E. Sablon, y E.J. Vandamme (1997). Isolation, purification and characterization of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 13-20.

Collier, D.N., V.A. Bankaitis, J.B. Weiss y P.J. Bassford, Jr. (1988). The antifolding activity of SecB promotes the export of the *E. coli* maltose-binding protein. *Cell*, 53: 273-283.

Collins, M.D., D. Jones, J.A. E. Farrow, R. Kilpper-Bälz y K.H. Schleifer (1984). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* nom. rev., comb. nov.; and *E. malodoratus* nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 220-223.

Collins, M.D., J.A.E. Farrow y D. Jones (1986). *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 8-12.

Collins, M.D., R.R. Facklam, J.A. E. Farrow y R. Williamson (1989). *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 57: 283-288.

Collins, M.D., U.M. Rodrigues, N.E. Pigott y R.R. Facklam (1991). *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12: 95-98.

Cookson, W (1996). En "Cazadores de genes. La aventura del genoma", p. 113. Eds. Pirámide, S. A., Madrid.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, 16: 10881-10890.

Crandall, A.D. y T.J. Montville (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 231-237.

Crooke, E., B. Guthrie, S. Lecker, R. Lill y W. Wickner (1988). ProOmpA is stabilized for membrane translocation by either purified *Escherichia coli* trigger factor or canine signal recognition particle. *Cell*, 54: 1003-1011.

Chen, Y. y T.J. Montville (1995). Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 684-690.

Chen, Y., R. Shapira, M. Eisenstein. y T.J. Montville (1997a). Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 524-531.

Chen Y., R.D. Ludescher y T.J. Montville (1997b). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6: 4770-4777.

Chen, Y., R. Ludescher y T.J. Montville (1998). Influence of lipid composition on pediocin PA-1 binding to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3530-3532.

Chikindas, M.L., M.-J. García-Garcerá, A.J.M. Driessen, A.M. Ledeboer, J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, T. Abee, W.N. Konings y G. Venema (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3577-3584.

Chikindas, M.L., K. Venema, A.M. Ledeboer, G. Venema y J. Kok (1995a). Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21: 183-189.

Chikindas, M.L., J. Novák, A.J.M. Driessen, W.N. Konings, K.M. Schilling y P.W. Caufield (1995b). Mutacin II, a bactericidal lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 2656-2600.

Chinachoti, N, T. Zaima, H. Matsusaki, K. Sonomoto y A. Ishizaki (1997). Relationship between nisin Z fermentative production and aeration condition using *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 43: 437-448

Chiu, I., J.A. Skoog, S.M. Tatini y L. McKay (1989). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by associative growth of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in fermented milk. *J. Anim. Sci.*, 67 (suppl. 1).

Daba, H., C. Lacroix, J. Huang y R.E. Simard (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesentericin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 166-173.

Daeschel, M.A.(1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 43: 164-167.

Dallas, H.L., V. Sathyamoorthy y A.D. Hitchins (1996). Purification of the anti-listerial bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* 108. *J. Food Safety*, 16: 183-199.

Dalbey, R.E y G. von Heijne (1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes- a new protease family. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 474-478.

Dathe, M. y T. Wieprecht (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 71-87.

Davies, E.A, M.B. Falahee y M.R. Adams (1996). Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *J. Appl. Bacteriol.*, 81: 139-146.

Davies, J. (1996). Bacteria on the rampage. *Nature*, 383: 219-220.

del Castillo, F.J., S.C. Leal, F. Moreno e I. del Castillo (1997). The *Escherichia coli* K12-*sheA* gene encodes a 34 kDa secreted haemolysin. *Mol. Microbiol.*, 25: 107-115.

Demel, R.A., T. Peelen, R.J. Siezen, B. DeKruijff y O.P. Kuipers (1996). Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study. *Eur. J. Biochem.*, 235: 267-274.

Derman, A.I., J.W. Puziss, P.J. Bassford Jr. y J. Beckwith (1993). A signal sequence is not required for protein export in *prlA* mutants of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 12: 879-888.

Dev, I.K., P.H. Ray y P. Novak (1990). Minimum substrate sequence for signal peptidase I of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 33: 20069-20072.

Devereux, J.P., P. Haeberli y O. Smithies (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids. Res.*, 12: 387-395.

De Vos, W.M., O.P. Kuipers, J.R. van der Meer y R.J. Siezen (1995). Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 17: 427-437.



- Devriese, L.A., K. Ceyssens, U.M. Rodrigues y M.D. Collins (1990). *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol. Lett.*, 71: 247-252.
- Devriese, L.A., B. Pot y M.D. Collins (1993). Phenotypic identification of the genes *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75:399-408.
- Devriese, L.A. y B. Pot (1995). The genus *Enterococcus*. En “*The Genera of Lactic Acid Bacteria*”, Vol. 2, pp. 327-367. Wood, B. J. B. y W. H. Holzapfel. (eds.). Blackie Academic and Professional, Londres.
- Devriese, L.A., B. Pot, L.V. Damme, K. Kersters y F. Haesebrouck (1995). Identification of *Enterococcus* species isolated from animal origin. *Food Microbiol.*, 26: 187-197.
- De Vrije, T., A.M. Batenburg, J.A. Killian y B. De Kruijff (1990). Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 4: 143-150.
- De Vuyst, L y E.J. Vandamme (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 571-578.
- De Vuyst, L. y E.J. Vandamme (1993). Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40: 17-22.
- De Vuyst, L., R. Callewaert y K. Crabbè (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. *Microbiology*, 142: 817-827.
- Diep, D.B., L.S. Håvarstein e I.F. Nes (1995). A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.*, 18: 631-639.
- Diep, D.B., L.S. Håvarstein e I.F. Nes (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, 178: 4472-4483.
- Dihn, T., I.T. Paulsen y M.H. Saier, Jr. (1994). A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 176: 3825-3831.
- Dodd, H.M., N. Horn, C.J. Giffard y M.J. Gasson (1996). A gene replacement strategy for engineering nisin. *Microbiology*, 142: 47-55.

Dougherty, B.A., C. Hill, J.F. Weidman, D.R. Richardson, J.C. Venter y R.P. Ross (1998). Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.*, 29: 1029-1038.

Driessen, A.J.M. (1992). Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the proton motive force. *EMBO J.*, 11: 847-853.

Driessen, A.J.M. (1993). SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* protein translocase, is functional as a dimer. *Biochemistry*, 32: 13190-13197.

Driessen, A.J.M. (1994). How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Membr. Biol.*, 142: 145-149.

Driessen, A.J.M., H.W. van de Hooven, W. Kuiper, M. van de Kamp, H.-G. Sahl, R.N.H. Konings y W.N. Konings (1995a). Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34: 1606-1614.

Driessen, A.J.M., J.G. de Wit, W. Kuiper, J.P. van der Wolk, P. Fekkes, C. van der Does, K. van Wely, E.H. Manting y T. den Blaauwen (1995b). SecA, a novel ATPase that converts chemical energy into a mechanical force to drive precursor protein translocation. *Biochem. Soc. Trans.*, 23: 981-985.

Dufour, A., D. Thuault, A. Boulliou, C.M. Bourgeois y J.P. Le Pennec. (1991). Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2423-2429.

Duong, F. y W. Wickner (1997a). Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein. *EMBO J.*, 16: 2756-2768.

Duong, F. y W. Wickner (1997b). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.*, 16: 4871-4879.

Duong, F., J. Eichler, A. Price, M.R. Leonard y W. Wickner (1997c). Biogenesis of the Gram-negative bacterial envelope. *Cell*, 91:567-573.

Economou, A. y W. Wickner (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*, 91:5 67-593.

Eijsink, V.G.H., M.B. Brurberg, P.H. Middelhoven e I.F. Nes (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.*, 178: 2232-2237.

- Eijssink, V.G.H., M. Skeie, P.H. Middelhoven, M.B. Brurberg e I.F. Nes (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3275-3281.
- Eisenberg, D. (1984). Three-dimensional structure of membrane y surface proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 595-623.
- Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. Van Dorselaer, F. Bringel, J.C. Hubert y C. Hasselman (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4381-4387.
- Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Assobhei y C. Hasselmann (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 521-526.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, A. Ishizaki (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 85-106
- Epand, R.M. y H.J. Vogel (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 11-28.
- Facklam, R. y J.A. Elliot (1995). *Enterococcus*. En “*Manual of Clinical Microbiology*”, pp. 308-314. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover y R. H. Tenover (eds.). ASM Press, Washington DC.
- Falla, T., D.M. Karunaratne y R.E.W. Hancock (1996). Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.*, 271: 19298-19303.
- Farías, M.E., A.A.P. de Ruiz Holgado y F. Sesma (1994). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. *J. Food Prot.*, 57: 1013-1015.
- Farías, M.E., R.N. Farías, A.P. de Ruíz Holgado y F. Sesma (1996). Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL35, a “pediocin-like” bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22: 417-419.
- Farrow, J.A.E. y M.D. Collins (1985). *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 73-75.
- Fath, M.J. y R. Kolter (1993). ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol. Rev.*, 57: 995-1017.

Food and Drug Administration (1988). Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Reg.*, 53: 11247-11250.

Fekkes, P., T. den Blaauwen y A.J.M. Driessen (1995). Diffusion-limited interaction between unfolded polypeptides and the *Escherichia coli* chaperone SecB. *Biochemistry*, 34: 10078-10085.

Fekkes, P., C. van der Does y A.J.M. Driessen (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.*, 16: 6105-6113.

Fekkes, P. y A.J.M. Driessen (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 161-173.

Fields, F.O. (1996). Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. *J. Food Prot.*, (suppl.) 72-77.

Fimland, G., O. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I.F. Nes y J. Nissen-Meyer (1996). New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3313-3318.

Fimland, G., R. Jack, G. Jung, I.F. Nes y J. Nissen-Meyer (1998). The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 5057-5060.

Fleury, Y., M.A. Dayem, J.J. Montagne, E. Chaboisseau, J.P. Le Caer, P. Nicolas y A. Delfour (1996). Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y105<sup>37</sup>, a defensive peptide from Gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biol. Chem.*, 271: 14421-14429.

Floriano, B., J.L. Ruiz-Barba y R. Jiménez-Díaz (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4883-4890.

Fons, M., T. Hege, M. Ladire, P. Raibaud, R. Ducluzeau y E. Maguin (1997). Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid* 37: 199-203.

Franke, C.M. (1998). Topology of a Type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen. Holanda.

- Franke, C.M., K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman, J. Kok, G. Venema y K. Venema (1996). Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 178: 1766-1769.
- Franz, C.M., U. Schillinger y W.H. Holzapfel (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 255-270.
- Franz, C.M., R.W. Worobo, L.E. Quadri, U. Schillinger, W.H. Holzapfel, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1999). Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2170-2178.
- Frémaux, C., C. Ahn y T.R. Klaenhammer (1993). Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3906-3915.
- Frémaux, C., Y. Héchard y Y. Cenatiempo (1995). Mesentericin Y105 gene cluster in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*, 141: 1637-1645.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378.
- Galas, D.J. y M. Chandler (1989). Bacterial insertion sequences. En “*Mobile DNA*”, pp. 109-162. D. E. Berg y M. M. Howe (eds.). American Society for Microbiology, Washington DC.
- Gallagher, N.L., M. Sailer, W.P. Niemczura, T.T. Nakashima, M.E. Stiles y J.C. Vederas (1997). Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecyl phosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*, 36: 15062-15072.
- Gálvez, A., M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada y E. Montoya (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.*, 32: 765-771.
- Gálvez, A., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno y E. Valdivia (1991). Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.*, 173: 886-892.
- Ganz, T. y R.I. Lehrer (1997). Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr. Opin. Hematol.*, 4: 53-58.

Gänzle, M.G., C. Hertel y W.P. Hammes (1996). Modelling the effect of pH, NaCl and nitrite concentrations on the antimicrobial activity of sakacin P against *Listeria ivanovii* DSM 20750. *Fleischwirtschaft*, 76: 409-412.

Gao, F.H., T. Abee y W.N. Konings (1991). Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2164-2170.

García-Garcerá, M.J., M.G.L. Elferink, A.J.M. Driessen y W.N. Konings (1993). In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of proton motive force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, 212:417-422.

Garriga, M., T. Aymerich, S. Costa, J.M. Monfort y M. Hugas (2000). Las altas presiones en combinación con bacteriocinas como nueva tecnología de conservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, 87: 59-63.

Geis, A., J. Singh y M. Teuber (1983). Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 205-211.

Gilliland, S.E. (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 175-188.

Gilson, L., H.K. Mahanty y R. Kolter (1990). Genetic analysis of an MDR-like export sistem: the secretion of colicin V. *EMBO Journal*, 9: 3875-3884.

Giraffa, G., E. Neviani y G. Torri Tarelli (1994). Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an Italian soft cheese. *J. Dairy Sci.*, 77: 1176-1182.

Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacterocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.*, 12: 291-299.

Giraffa, G., D. Carminati y G. Torri Tarelli (1995). Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J. Food Prot.*, 58: 621-623.

Giraffa, G., D. Carminati y E. Neviani (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food. Prot.*, 60: 732-738.

González, B., P. Arca, B. Mayo y J.E. Suárez (1994). Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2158-2163.

- González, B., E. Glaasker, E.R.S. Kunji, A.J.M. Driessen, J.E. Suárez, y W.N. Konings. (1996). Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2701-2709.
- Gould, G.W. (1992). Ecosystems approach to food preservtion. *J. Appl. Bacteriol.*, 73 (suppl.): 58S-68S.
- Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot.*, (suppl.): 82-86.
- Hall, L.M.C., B. Duke, M. Guiney y R. Williams (1992). Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 915-919.
- Hammes, P.W., A. Bantleon y S. Min (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 165-174.
- Hanada, M, K. Nishiyama, S. Mizushima y H. Tokuda (1994). Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins SecY, SecE, and SecG (p12). *J. Biol. Chem.*, 269: 23625-23631.
- Hancock, R.E.W., T. Falla y M. Brown (1995). Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 37: 135-175.
- Hancock, R.E.W.(1997). Peptide antibiotics. *Lancet*, 349: 418-422.
- Hancock, R.E.W. y R. Lehrer (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 16: 82-88.
- Hancock, R.E.W. y D.S. Chapple (1999). Peptide antibiotics. *Antimicr. Agents Chemother.*, 43: 1317-1323.
- Hansen, J. N. (1994). Nisin as a model food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34: 69-93.
- Hardie, J.M. y R.A. Whiley (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 83: 1S-11S.
- Harris, L.J., H.P. Fleming y T.R. Klaenhammer (1992). Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1477-1483.
- Hartl, F.-U., S. Lecker, E. Schiebel, J.P. Hendrick y W. Wickner (1990). The binding of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* membrane. *Cell*, 63: 269-279.

- Hartmann, E., T. Sommer, S. Prehn, D. Gorlich, S. Jentsch y T.A. Rapoport (1994). Evolutionary conservation of the components of the protein translocation complex. *Nature*, 367: 654-657.
- Hastings, J.W., M. Sailer, K. Johnson, K.L. Roy, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, 173: 7491-7500.
- Hauge, H.H., J. Nissen-Meyer, I.F. Nes y V.G.H. Eijsink (1998a). Amphiphilic  $\alpha$ -helices are important structural motifs in the  $\alpha$  and  $\beta$  peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G. Enhancement of helix formation upon  $\alpha$ - $\beta$  interaction. *Eur. J. Biochem.*, 251: 565-572.
- Hauge, H. H., D. Mantzilas, G. N. Moll, W. N. Konings, A. J. M. Driessen, V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer (1998b). Plantaricin A is an amphiphilic  $\alpha$ -helical bacteriocin which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry*, 37: 16026-16032.
- Hauge, H.H., D. Mantzilas, V.G.H. Eijsink y J. Nissen-Meyer (1999). Membrane-mimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. *J. Bacteriol.*, 181: 740-747.
- Håvarstein, L.S., J. Nissen-Meyer e I.F. Nes (1993). Characterization of the genes involved in production and secretion of lactococcin G, a bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 142-150.
- Håvarstein, L.S., H. Holo e I.F. Nes (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 140: 2383-2389.
- Håvarstein, L.-S., D.B. Diep e I.F. Nes (1995a). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, 16: 229-240.
- Håvarstein, L.-S., G. Coomaraswamy y D.A. Morrison (1995b). An unidentified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92: 11140-11144.
- Heaton, M.P., L.F. Discotto, M.J. Pucci y S. Handwerger (1996). Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. *Gene*, 171: 9-17.



- Héchar, Y., B. Derijard, F. Letellier y Y. Cenatiempo (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2725-2731.
- Héchar, Y., J.M. Berjeaud y Y. Cenatiempo (1999). Characterization of the *mesB* gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Current Microbiol.*, 39: 265-269.
- Hellingwerf, K. J. y W. N. Konings (1985). The energy flow in bacteria: the main free energy intermediates and their regulatory role. *Adv. Microbial Physiol.*, 26: 125-154.
- Henderson, J.T., A.L. Chopko y P.D. van Wassenaar (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.*, 295: 5-12.
- Herman, D.J. y D.N. Gerding (1991). Antimicrobial resistance among enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35: 31-38.
- Hernández, P.E., J.M. Rodríguez, L.M. Cintas, W.L. Moreira, O.J. Sobrino, M.F. Fernández y B. Sanz (1993). Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiol. SEM*, 9: 37-48.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganism to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8: 67-113.
- Hikita, C. y S. Mizushima (1992). The requirement of a positive charge at the amino terminus can be compensated for by a longer central hydrophobic stretch in the functioning of signal peptides. *J. Biol. Chem.*, 267: 12375-12379.
- Hirt, H., R. Wirth y A. Muscholl (1996). Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from *Enterococcus faecalis*: detection of a new insertion element on pPD1 and implications for the evolution of this plasmid family. *Mol. Gen. Genet.*, 252: 640-647.
- Holck, A., L. Axelsson, S-E. Birkeland, T. Aukrust y H. Blom (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2715-2720.
- Holck, A., Axelsson, L., Hühne, S.K. y Kröckel, L. (1994a). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.*, 115: 143-150.
- Holck, A. L., L. Axelsson y U. Schillinger (1994b). Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Current Microbiol.*, 29: 63-68.

Holck, A., L. Axelsson y U. Schillinger. (1996). Divergicin 750, a novel bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* 750. *FEMS Microbiol. Lett.*, 136: 163-168.

Holo H., O. Nissen e I.F. Nes (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173:3879-3887.

Holt, J.H., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley y S.T. Williams (1994). “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*”, 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.

Holzapel, W.H., R. Geisen y U. Schillinger (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 343-362.

Horn, N., S. Swindell, H.M. Dodd y M.J. Gasson (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.*, 228: 129-135.

Horn, N., M.I. Martínez, J.M. Martínez, P.E. Hernández, M.J. Gasson, J.M. Rodríguez y H.M. Dodd (1998). Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 818-823.

Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez y H. M. Dodd (1999). Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4443-4450.

Hromy, J.M. y G.M. Carman (1986). Reconstitution of *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylserine synthase into phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.*, 261; 15572-15576.

Hugas, M., M. Garriga, M.T. Aymerich y J.M. Monfort (1993). Biochemical characterization of lactobacilli isolated from dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 18: 107-113.

Hugas, M., Garriga, M.T. Aymerich y J.M. Monfort (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.*, 79: 322-330.

Hühne, K., Axelson, L., Holck, A. y L. Kröeckel (1996). Analysis of sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin P negative *Lb. sake* strains. *Microbiology*, 142: 1437-1448.

Huie, J.L. y T.J. Silhavy (1995). Suppression of signal sequence defects and azide resistance in *Escherichia coli* commonly result from the same mutations in *secA*. *J. Bacteriol.*, 177: 3518-3526.

- Hurst, A. (1981). Nisin. En “*Advances in Applied Microbiology*”, vol. 27. Perlman D. y A. I. Laskin (eds.). Academic Press, Nueva York.
- Hynes, W., J.J. Ferreti y J.R. Tagg (1993). Cloning of the gene encoding streptococcin A-FF22, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes* and determination of its nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1969-1971.
- Iino, T., M. Takahashi y T. Sako (1987). Role of aminoterminal positive charge on signal peptide in staphylokinase export across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 262: 7412-7417.
- Izard, J.W. y D.A. Kendall (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.*, 13: 765-773.
- Jack, R.W., J.R. Tagg y B. Ray (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.
- Janda, J.M. y S.L. Abbott (1999). Unusual food-borne pathogens. *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella* species. *Clin. Lab. Med.*, 19: 553-582.
- Jensen, P.R. y K. Hammer (1993). Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4363-4366.
- Jezek, P., F. Mahdi, y K.D. Garlid (1990). Reconstitution of the beef heart and rat liver mitochondrial  $K^+/H^+$  ( $Na^+/H^+$ ) antiporter. Quantitation of  $K^+$  transport with the novel fluorescent probe, PBFI. *J. Biol. Chem.*, 265: 10522-10526.
- Jiménez-Díaz, R., R.M. Ríos-Sánchez, M. Desmezeaud, J.L. Ruiz-Barba y J.C. Piard (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl Environ. Microbiol.*, 59: 1416-1424.
- Jiménez-Díaz, R., J.L. Ruiz-Barba, D.P. Cathcart, H. Holo, I.F. Nes, K.H. Sletten. y P.J. Warner (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4459-4463.
- Joerger, M. y T.R. Klaenhammer (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, 167: 439-446.

Joly, J.C., M. Leonard y W. Wickner (1994). Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4703-4707.

Jones, B.A., R.E. Muck y S.C. Ricke (1991). Selection and application of *Streptococcus bovis* as a silage inoculant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3000-3005.

Jung, D.S., F.W. Bodyfelt y M.A. Daeschel (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.*, 75: 387-393.

Kaiser, A y T.J. Montville (1993). The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 536-540.

Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.*, 61: 425-431.

Kaletta, C. y K.-D. Entian (1989). Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the nisA gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.*, 171: 1597-1601.

Kalina, A. P. (1970). Taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20: 185-189.

Kanatani, K., M. Oshimura y K. Sano (1995). Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1061-1067.

Kato, K., T. Matsuda, Y. Yoneyama, H Kato y R. Nakamura (1993). Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 551-556.

Kerstens, K y J. De Ley (1975). Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.*, 87: 333-342.

Kim, W.S., R.J. Hall y N.W. Dunn (1997). The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 449-453.

Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86.

- Kleerebezem, M., L.E.N. Quari, O.P. Kuipers y W. De Vos (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 24: 895-904.
- Klein, C., C. Kaletta y K.D. Entian (1993). Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 296-303.
- Klein, G., A. Pack y G. Reuter (1998). Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1825-1830.
- Knudtson, L.M. y P.A. Hartman (1993). Antibiotic resistance among enterococcal isolates from environmental and clinical sources. *J. Food Prot.*, 56: 489-492.
- Konings, W.N. y P.A.M. Michels (1980). Solute transport in bacteria. En “*Diversity of Bacterial Respiratory Systems*”, pp. 33-87. C. J. Knowles (ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Konings, W. N., B. Poolman y A. J. M. Driessen (1989). Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Crit. Rev. Microbiol.*, 16:419-476.
- Kramer, J. y H. Brandis (1975). Purification and characterization of two bacteriocins from *Streptococcus faecium*. *J. Gen. Microbiol.*, 88: 93-100.
- Kramer, J., J. Kennes y H. Brandis (1983). Transfer of a miniplasmid determining bacteriocin production and bacteriocin immunity in *Streptococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 20: 385-389.
- Krier, F., A.M. Revol-Junelles y P. Germain (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 359-363.
- Kuipers, O.P., M.M. Beerthuyzen, P.G.G.A. de Ruyter, E.J. Luesink y W.M. de Vos (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 270: 27299-27304.
- Kumamoto, C.A. (1991). Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol. Microbiol.*, 5: 19-22.
- Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C.R. Banner y J.L. Fryer (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 406-409.

Kyte, R.J y R.F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132.

Larsen, A.G., F.K. Vogensen y J. Josephsen (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 113-122.

Lauková, A., M. Mareková y P. Javorsky (1993). Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16: 257-260.

Lauková, A. (1996). Enterococci associated with the rumen of different ruminants. *Biomed. Letters*, 54: 27-30.

Lauková, A. y P. Juris (1997). Distribution and characterization of *Enterococcus* species in municipal sewages. *Microbios*, 89: 73-80.

Lauková, A. y S. Czikková (1998a). Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 215-218.

Lauková, A., S. Czikková, Z. Vasiloková, P. Juris y M. Mareková (1998b). Occurrence of bacteriocin production among environmental enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27: 178-182.

Lauková, A., S. Czikková, T. Dobránsky y O. Burdová (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. *Food Microbiology*, 16: 93-99.

Leclercq, R., S. Dutka-Malenand y A. Brisson-Noel (1992). Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin. Infect. Dis.*, 15: 495-501.

Leer, J.R., J.M.B. van der Vosse, M. van Gieze, J.M. van Noort y P.H. Pouwels (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, 141: 1629-1635.

Leistner, L. y G.M. Gorris (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.*, 6: 41-46.

Lejeune, R., R. Callewaert, K. Crabbè y L. De Vuyst (1998). Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 159-168.

- Lemcke, R. y M. Bülte (1997). Feintypisierung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch, pp. 162-169. En “38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft in Garmisch-Partenkirchen”. DVG, Gießen, Alemania.
- León, J. y J.M. García (1992). Expresión genética y su control en procariotas. En “*Manual de Genética Molecular*”, pp. 107-134. J. León y J. M. García (eds.. Ed. Síntesis, S. A., Madrid.
- Leroy, F. y L. De Vuyst (1999a). Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 974-981.
- Leroy, F. y L. De Vuyst (1999b). The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5350-5356.
- Lewus, C.B., A. Kaiser y T.J. Montville. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1683-1688.
- Li, P., J. Beckwith y H. Inouye (1988). Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7685-7689.
- Lill, R., W. Dowan y W. Wickner (1990). The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domain of precursor proteins. *Cell*, 60: 271-280.
- Lindgren S.E. y W.J. Dobrogosz (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 149-164.
- Lohner, K., E. J.Prenner (1999). Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 141-156.
- Loubiere, P., M. Coccagn-Bousquet, J. Matos, G. Goma y N.D. Lindley (1997). Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Appl. Microbiol.*, 82: 95-100.
- Low, D.E., B.M. Willey, S. Betschel y B. Kreiswirth (1994). Enterococci: pathogens of the 90s. *Eur. J. Surg.*, suppl 573: 19-24.

- Lyon, W.J., D.G. Olson y E.A. Murano (1995). Isolation and purification of enterocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. *J. Food Prot.*, 58: 890-898.
- Maftah, A., D. Renault, C. Vignoles, Y. Héchard, P. Bressollier, M.H. Ratinaud, Y. Cenatiempo y R. Julien (1993). Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. *J. Bacteriol.*, 175: 3232-3235.
- Magnuson, R., J. Solomon y A.D. Grossman (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. *Cell*, 77:207-216.
- Manting, E. (1999). Functional and structural analysis of the *Escherichia coli* translocase. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Holanda.
- Manting, E., C. van der Does, H. Remigy, A. Engel y A. J. M. Driessen (2000). SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.*, 19: 852-861.
- Marciset, O., M.C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet y B. Poolman (1997). Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 14277-14284.
- Margolles, A., M. Putman, H.-W. van Veen y W.N. Konings (1999). The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of *Lactococcus lactis* mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids. *Biochemistry*, 38: 16298-16306.
- Martin, I., J.M. Ruyschaert, D. Sanders y C.J. Giffard (1996). Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *Eur. J. Biochem.*, 239: 156-164.
- Martínez, B., M. Fernández, J.E. Suárez y A. Rodríguez (1999). Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*, 145: 3155-3161.
- Martínez, J.M. (2000). Producción y empleo de anticuerpos de especificidad predeterminada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterocina A y para el reconocimiento específico de su (co)expresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez, J.M., M.I. Martínez, A.M. Suárez, C. Herranz, P. Casaus, L.M. Cintas, J.M. Rodríguez y P.E. Hernández (1998). Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4536-4545.



- Martínez, J.M., J. Kok, J.W. Sanders y P.E. Hernández (2000). Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3543-3549.
- Martínez, M.I. (1999). Expresión heteróloga de la pediocina PA-1 en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez-Bueno, M., M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. van Beeumen, J. Coyette y E. Valdivia (1994). Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.*, 176: 6334-6339.
- Martínez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Gálvez, J. Coyette y M. Maqueda (1998). Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.*, 27: 347-358.
- Martínez-Murcia, A.J. y M.D. Collins (1991). *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 80: 69-74.
- Matsuyama, S., Y. Fujita y S. Mizushima (1993). SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 12: 265-270.
- Matsusaki, H., N. Endo, K. Sonomoto e I. Ishikazi (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45: 36-40.
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 1-10.
- Mazzotta, A.S. y T.J. Montville (1997). Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *J. Appl. Microbiol.*, 82: 32-38.
- McAuliffe, O., M.P. Ryan, R. Paul Ross, C. Hill, P. Breeuwer y T. Abbe. (1998). Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:439-44.
- McKay, A.M. (1990). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 62: 4095-4099.
- McMullen, L y M.E. Stiles (1996). Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, (suppl) 64-71.

- McCormick, J.K., R.W. Worobo y M.E. Stiles (1996). Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4095-4099.
- McCormick, J.K., T.R. Klaenhammer y M.E. Stiles (1999). Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29: 37-41.
- Mendoza, F., M. Maqueda, A. Gálvez, M. Martínez-Bueno y E. Valdivia (1999). Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48 adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 618-625.
- Métivier, A., M.-F. Pilet, X. Douset, O. Sorokine, P. Anglade, M. Zagorec, J.-C. Piard, D. Marion, Y. Cenatiempo y C. Fremaux (1998). Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology*, 144: 2837-2844.
- Meyer, T.H., J.F. Ménétré, R. Breitling, K.R. Miller, C.W. Akey y T.A. Rapoport (1999). The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.*, 285: 1789-1800.
- Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J.M. Ruysschaert y G. Cornelis (1990). Secretion of Yop proteins by yersiniae. *Infect. Immun.*, 58: 2840-2849.
- Miguel, M.A.L., L. Teixeira y A.L.S. Noletto (1995). Characterization of *Enterococcus* strains isolated from ready-to-eat foods. *Rev. Microbiol.*, 26: 121-124.
- Miller, K.W., R. Schamber, Y. Chen y B. Ray (1998). Production of active chimeric pediocin PA-1 in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from *Pediococcus pap* operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 14-20.
- Ming, X. y M.A. Daeschel (1995). Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.*, 58: 416-420.
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 41: 445-502.
- Moellering, R.C. (1991). The enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. *J. Antim. Chemother.*, 28: 1-12.
- Moellering, R.G., Jr. (1992). Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.*, 14: 1173-1178.

- Molenaar, D., T. Abee y W. N. Konings (1991). Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochim. Biophys. Acta*, 1115, 75-83.
- Moll, G.N., T. Ubbink-Kok, H. Hildeng-Hauge, J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, W.N. Konings y A.J.M. Driessen (1996). Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *J. Bacteriol.*, 178:600-605.
- Moll, G.N., J. Clark, W.C. Chan, B.W. Bycroft, G.C.K. Roberts, W.N. Konings y A.J.M. Driessen (1997). Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. *J. Bacteriol.*, 179: 135-140.
- Moll, G.N., W.N. Konings y A.J.M. Driessen (1998a). The lantibiotic nisin induces transmembrane movement of a fluorescent phospholipid. *J. Bacteriol.*, 180: 6565-6570.
- Moll, G.N., H. Hildeng-Hauge, J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, W.N. Konings y A.J.M. Driessen (1998b). Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. *J. Bacteriol.* 180: 96-99.
- Moll, G.N., W.N. Konings y A.J.M. Driessen (1999a). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 185-198.
- Moll, G.N., E. van den Akker, H.H. Hauge, J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, W.N. Konings y A.J.M. Driessen (1999b). Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J. Bacteriol.*, 181: 4848-4852.
- Montville, T.J. y A.L. Kaiser (1993). Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. En "*Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*", pp.1-22. Academic Press, Inc.
- Montville, T.J., y M.E.C. Bruno (1994). Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.*, 24:53-74.
- Montville, T.J., K. Winkowski y R.D. Ludescher (1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *Int. Dairy J.*, 5: 797-814.
- Montville, T.J. y Y. Chen (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50:511-519.
- Montville, T.J., H.-J. Chung y Y. Chen (1999). Nisin A depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28: 189-193.

- Mor, A. y P. Nicolas (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur. J. Biochem*, 219: 145-154.
- Moreira, W.L. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347 de origen cárnico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid..
- Møretrø, T., B. F. Hagen y L. Axelsson (1998). A new, completely defined medium for meat lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 715-722.
- Møretrø, T., I.M. Assen, I. Storrø y L. Axelsson (2000). Production of sakacin P in *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 536-545.
- Morfeldt, E., K. Tegmark y S. Arvidson (1996). Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 21: 1227-1237.
- Morgan, S., R.P.Ross y C. Hill (1995). Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2995-3001.
- Morgenstern, B. (1999). DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics*, 15: 211 - 218.
- Mørtvedt C.I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten e I.F. Nes (1991). Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1829-1834.
- Mørtvedt-Abildgaard, C.I., J. Nissen-Meyer, B. Jelle, B. Grenov, M. Skaugen e I.F. Nes (1995). Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 175-179.
- Motlagh, A.M., A.K. Bhunia, F. Szostek, T.R. Hansen, M.C. Johnson y B. Ray. (1992). Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15: 45-48.
- Mulders, J.W.M., I. Boerrigter, H.S. Rollema, R.J. Siezen y W.M. de Vos (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201: 581-584.
- Muñoz, R., R. López y E. García (1998). Characterization of IS1515, a functional insertion sequence in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 180: 1381-1388.
- Muriana, P.M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. *Int. J. Food Prot.*, suppl. 1996: 54-63.

- Muriana, P.M. y T.R. Klaenhammer (1987). Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 553-560.
- Muriana, P.M. y T.R. Klaenhammer (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 114-121.
- Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9: 40-65.
- Naïmi, A., G. Beck y C. Branlant (1997). Primary and secondary structures of rRNA spacer regions in enterococci. *Microbiology*, 143: 823-34.
- Naïmi, A., G. Beck, M. Monique, G. Lefèbvre y C. Branlant (1999). Determination of the nucleotide sequence of the 23S ribosomal RNA and flanking spacers of an *Enterococcus faecium* strain reveals insertion-deletion events in the ribosomal spacer 1 of enterococci. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22: 9-21.
- Nes, I.F. y J.R. Tagg (1996). Novel lantibiotics and their prepeptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 89-97.
- Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Håvarstein, M.B. Brurberg, V.G. Eijsink y H. Holo (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.
- Nes, I.F. y V.G.H. Eijsink (1999). Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. En: “*Cell-Cell Signaling in Bacteria*”. G. M. Dunny y S. C. Winans (eds). American Society from Microbiology, Washington, DC.
- Nettles, C.G. y S.F. Barefoot (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 56 338-356.
- New, R.R.C. (1992). *Liposomes: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Inglaterra.
- Nicholls, D. G. y S. J. Ferguson (1992). Ion transport across energy-conserving membranes. En “*Bioenergetics*”, pp. 23-37. H. B. Jovanovich Publishers, Academic Press, Nueva York.
- Nieto Lozano, J.C., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, C. Peláez e I.F. Nes (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1985-1990.
- Nilsen, T., I.F. Nes y H. Holo (1998). An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.*, 180: 1848-1854.

Nilsen, T., I.F. Nes y H. Holo (2000). Enterolysin A, a novel cell wall degrading bacteriocin secreted from *E. faecalis* LMG 2333. *J. Bacteriol.*, (enviado).

Nissen-Meyer, J.A., H. Holo, L.S. Håvarstein, K. Sletten e I.F. Nes (1992a). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, 174: 5686-5692.

Nissen-Meyer, J.A., G. Larsen, K. Sletten, M. Daeschel e I.F. Nes (1992b). Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 1973-1978.

Nissen-Meyer, J. e I.F. Nes (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.*, 167: 67-77.

Nousiainen, J. y J. Setälä (1998). Lactic acid bacteria as animal probiotics. En “*Lactic Acid Bacteria*”, pp. 437-473. Salminen, S. y A. Von Wright (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.

Ohmomo, S., S. Murata, N. Katayama, S. Nitisinprasart, M. Kobayashi, T. Nakajima, M. Yajima y K. Nakanishi (2000). Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 81-89.

O’Keeffe, T., C. Hill y R. Paul Ross (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1506-1515.

Okereke, A y T.J. Montville (1992). Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 2463-2467.

Olasupo, NA., U. Schillinger, C.M.A.P. Franz y W.H. Holzapfel (1994). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from “wara”- a fermented skimmed cow milk product from West Africa. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19: 438-441.

Olson, E.R. (1993). Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol. Microbiol.*, 8: 5-14.

Osborne, R.S. y T.J. Silhavy (1993). PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. *EMBO J.*, 12: 3391-3398.

Ouwehand, A.C (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En “*Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*”, pp. 139-159. Salminen, S. y A. von Wright (eds.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.

- Palacios, J., G. Vignolo, M.E. Farias, A.P. de Ruiz Holgado, G. Oliver, G. y F. Sesma (1999). Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705.
- Papathanosopoulos, M.A., F. Krier, A.M. Revol-Junelles, G. Lefebvre, J.P. LeCaer, A. von Holy y J. W. Hastings (1997). Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc/Weisella* strains. *Curr. Microbiol.*, 35: 331-335.
- Parente, E., F. Villani, R. Coppola y S. Coppola (1989). A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella chesse manufacture. *Lait*, 69: 271-279.
- Parente, E. y C. Hill. (1992a). Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 55: 497-502.
- Parente, E. y C. Hill. (1992b). Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Prot.*, 55: 503-508.
- Parente, E. y C. Hill (1992c). A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 290-298.
- Parente, E y A. Ricciardi (1994). Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19: 12-15.
- Parente, E. A. Ricciardi y G. Addario (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 388-394.
- Parente, E. y A. Ricciardi (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 628-838.
- Paynter, M.J.B., K.A. Brown y S.S. Hayasaka (1997). Factors affecting the production of an antimicrobial agent, plantaricin F, by *Lactobacillus plantarum* BF001. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24: 159-165.
- Piard, J.C., F. Delorme, G. Giraffa, J. Commissaire y M. Desmazeaud (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ481. *Neth. Milk Dairy J.*, 44: 143-158.
- Piard, J.C. y M. Desmazeaud (1992a). Inhibiting factor produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism-end products. *Lait*, 71: 525-541.

Piard, J.C. y M. Desmazeaud (1992b). Inhibiting factor produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142.

Piard, J.C., P.M. Muriana, M.J. Desmazeaud y T.R. Klaenhammer. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 279-284.

Piva, A. y D.R. Headon (1994). Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiology*, 140: 697-702.

Pohlschröder, M., W.A. Prinz, E. Hartmann y J. Beckwith (1997). Protein translocation in the three domains of life: Variations on a theme. *Cell*, 91: 563-566.

Pompei, R., F. Berlutti, M.C. Thaller, A. Ingiani, G. Cortis y B. Dainelli (1992). *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 365-369.

Poolman, B., K.J. Hellingwerf y W.N. Konings (1987a). Regulation of the glutamate-glutamine transport system by intracellular pH in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 169: 2272-2276.

Poolman, R.M. J. Nijssen y W.N. Konings (1987b). Dependence of *Streptococcus lactis* phosphate transport on internal phosphate concentration and internal pH. *J. Bacteriol.*, 169: 5373-5378.

Poolman, B., E.J. Smid y W.N. Konings (1987c). Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine transport system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.*, 169: 2755-2761.

Pot, B., W. Hertel, W. Ludwig, P. Descheemaeker, K. Kersters y K.H. Schleifer (1993). Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridizations. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 513-517.

Pot, B., P. Vandamme y K. Kersters (1994). Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. En “*Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*”, pp. 493-521. Goodfellow, M. y A. G. O'Donnell (eds.). J. Wiley y Sons, Chichester, Inglaterra.

Prinz, W.A., C. Spiess, M. Ehrmann, C. Schierle y J. Beckwith (1996). Targeting of signal sequenceless proteins for export in *Escherichia coli* with altered protein translocase. *EMBO J.*, 15: 5209-5217.



- Pucci, M.J., E.R. Vedamuthu, B.S. Kunka y P.A. Vanderbergh (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2349-2353.
- Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57: 50-108.
- Quadri, L.E.N., M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.*, 269: 12204-12211.
- Quadri, L.E.N., Sailer, M., Terebiznik, M.R., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. (1995). Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.*, 177: 1144-1151.
- Quadri, L.E.N., M. Kleerebezem, O.P. Kuipers, W.M. de Vos, K.L. Roy, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1997). Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 179: 6163-6171.
- Rammelsberg, M., E. Muller y F. Radler (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiol.*, 154: 249-252.
- Ray, B. y M.A. Daeschel (1992). En “*Food Biopreservatives of Microbial Origin*”. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.
- Regassa, L.B. y M. Betley (1992). Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 174: 5059-5100.
- Revol-Junelles, A.M., R. Mathis, F. Krier, Y. Fleury, A. Delfour y G. Lefebvre (1996). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 120-124.
- Risøen, P.-A., L.S. Håvarstein, D.B. Diep e I.F. Nes (1998). Identification of the DNA-binding sites of two response regulators involved in regulation of bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Gen. Genet.*, 259: 224-232.
- Rodrigues, U. y M.D. Collins (1990). Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.*, 115: 205-212.

Rodríguez, J.M. (1991). Aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas de origen cárnico antagonistas del desarrollo de otros microorganismos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Rodríguez, J.M., L.M. Cintas, P. Casaus, A. Suárez y P.E. Hernández (1995a). PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2802-2805.

Rodríguez, J.M., L.M. Cintas, P. Casaus, N. Horn, H.M. Dodd, P.E. Hernández y M.J. Gasson (1995b). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 109-115.

Rodríguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, M. I. Martínez, A. Suárez y P. E. Hernández (1997). Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular biology techniques. *Food. Microbiol.*, 14: 363-371.

Ross, K.F., C.W. Ronson y J.R. Tagg. (1993). Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *sala* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1652-1657.

Sadaie, Y., H. Takamatsu, K. Nakamura y K. Yamane (1991). Sequencing reveals similarity of the wild-type *div*<sup>+</sup> gene of *Bacillus subtilis* to the *Escherichia coli* *secA* gene. *Gene*, 98: 101-105.

Sahl, H.G., R.W. Jack y G. Bierbaum (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, 230: 827-853.

Sahl, H.G. y G. Bierbaum (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activity of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52: 41-79.

Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis (1989). En “*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*”. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Samelis, J., F. Maurogenakis y J. Metaxopoulos (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 179-196.

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 5463-5467.

Saucier, L., A. Poon y M.E Stiles (1995). Induction of bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* LV17. *J. Appl. Bacteriol.*, 78:684-690.

- Saucier, L., A.S. Paradkar, L.S. Frost, L.S. Jensen y M.E. Stiles (1997). Transcriptional analysis and regulation of carnobacteriocin production in *Carnobacterium piscicola* LV17. *Gene*, 188: 271-277.
- Schägger, H. y G. von Jagow (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 167: 67-77.
- Schatz, P. J. y J. Beckwith (1990). Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.*, 24: 215-248.
- Schiebel, E., A.J.M. Driessen, F.-U. Hartl y W. Wickner (1991).  $\Delta\mu\text{H}^+$  and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*, 64: 927-939.
- Schiffer, M. y A.B. Edmundson (1967). Use of helical wheels to represent the structure of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.*, 7: 121-135.
- Schillinger, U. y F.K. Lücke (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1901-1906.
- Schillinger, U., R. Geisen y W.H. Holzapfel (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 7: 158-164.
- Schlaes, D.M. y B. Binczewski (1990). Enterococcal resistance to vancomycin and related cyclic glycopeptide antibiotics. *Am. J. Med.*, 91: 2-75.
- Schleifer, K.H. y R. Kilpper-Bälz (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *S. faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:31-31
- Schnell, N., G. Engelke, J. Augustin, R. Rosenstein, V. Ungermann, F. Götz y K.D. Entian (1992). Analysis of genes involved in the biosynthesis of lantibiotic epidermin. *Eur. J. Biochem.* 204: 57-68.
- Scott, M.G., H. Yan y R.E.W. Hancock (1999). Biological properties of structurally related  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 67: 2005-2009.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 55-70.
- Sherman, J. M. (1937). The streptococci. *Bacteriol. Rev.*, 1: 3-97.

Siezen, R.J., O.P. Kuipers y W.M. de Vos (1996). Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 171-184.

Silhavy, T.J., S.A. Benson y S.D. Emr (1983). Mechanisms of protein localization. *Microbiol. Rev.*, 47: 313-344.

Sims, P.J., A.S. Waggoner, C.-H. Wang, y J.F. Hoffman (1974). Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, 13: 3315-3330.

Simonen, M. e I. Palva (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.*, 57: 109-137.

Simpson, W.J. y J.R. Tagg (1986). M-type group A *Streptococcus* bacteriocin. *Can. J. Microbiol.*, 29: 1445-1451.

Sitaram, N y R. Nagaraj (1999). Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 29-54.

Skaugen, M. e I.F. Nes (1994). Transposition in *Lactobacillus sake* and its abolition of lactocin S production by insertion of IS1163, a new member of the IS3 family. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2818-2825.

Skaugen, M., L.M. Cintas e I.F. Nes (2000). Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En “*Genetics of Lactic Acid Bacteria*”, Vol. III. Wood, B.J.B y P. Warner (eds.). Aspen Publishers, Inc., EE.UU.

Smith, H., S. Bron, J. van Ee y G. Venema (1987). Construction and use of signal sequence selection vectors in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 169: 3321-3328.

Smith, J. L. y S. A. Palumbo (1981). Microorganisms as food additives. *J. Food Prot.*, 44: 936-955.

Sobrino, O.J. (1993). Caracterización parcial, bioquímica e inmunológica, de una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus sake* 148. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Sobrino, O.J., J.M. Rodríguez, W.L. Moreira, M.F. Fernández, B. Sanz y P.E. Hernández (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 13: 1-10.

- Sobrinho, O.J., J.M. Rodríguez, W.L. Moreira, L.M. Cintas, M.F. Fernández, B. Sanz y P.E. Hernández (1992). Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.*, 16: 215-225.
- Stackebrandt, E. y M. Teuber (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70:317-324.
- Stephens, S., B. Floriano, D.P. Cathcart, S.A. Bailey, V.F. Witt, R. Jiménez-Díaz, P.J. Warner y J.L. Ruíz-Barba (1998). Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1871-1877.
- Stevens, K.A., Sheldom, B.W., Klapes, N.A. y Klaemhammer, T.R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3613-3615.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Stiles, M. E. y W. H. Holzapfel (1997). Lactic acid bacteria and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36: 1-29.
- Stoddard, G.W., J.P. Petzel, M.J. van Belkum, J. Kok y L.L. McKay (1992). Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1952-1961.
- Stoffels, G., J. Nissen-Meyer, A. Guomundsdóttir, K. Sletten, H. Holo, H. e I.F. Nes (1992). Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1417-1422.
- Suárez, A.M. (1997). Producción de anticuerpos frente a la nisina A: estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sudirman, I., F. Mathieu, V. Benoit y G. Lefevbre (1994). Properties of two bacteriocins synthesized by *Leuconostoc* strains. *Curr. Microbiol.*, 28: 155-159.
- Suh, J.W., S.A. Boylan, S.M. Thomas, K.M. Dolan, D.B. Oliver y C.W. Price (1990). Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Mol. Microbiol.*, 4: 305-314.
- Svirsky, R.C., S. Reginald y X.Y. Shen (1995). Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 177: 6153-6159.

- Swaving, J., K.H.M. van Wely y A.J.M. Driessen (1999). Preprotein translocation by a hybrid translocase composed of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* subunits. *J. Bacteriol.*, 181: 7021-7027.
- Szoka, F.J. y D. Papahadjopoulos (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani y L.W. Wanamaker (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Tahara, T. y K. Kanatani (1996). Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1229. *J. Appl. Bacteriol.*, 81: 669-677.
- Tahara, T., M. Oshimura y K. Kanatani (1996a). Mode of action of acidocin 8912, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 192-194.
- Tahara, T., M. Oshimura, C. Umezawa y K. Kanatani (1996b). Isolation, partial characterization, and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM1132. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 892-897.
- Tahara, T., S. Yoshioka, R. Utsumi y K. Kanatani. (1997). Isolation an partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* JCM2124. *FEMS Microbiol. Lett.*, 148: 97-100.
- Tamine, A.Y. (1990). Microbiology of “starter cultures”. En “*The Microbiology of Milk Products*”, pp. 131-201. Robinson, R. K. (ed.). Elsevier Applied Science, Londres.
- ten Brink, B. y W.N. Konings (1982). Electrochemical proton gradient and lactate concentration gradient in *Streptococcus cremoris* cells grown in batch culture. *J. Bacteriol.*, 152: 682-686.
- ten Brink, R. Otto, U.-P. Hansen y W.N. Konings (1985). Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.*, 162: 383-390.
- ten Brink, B., M. Minekus, J.M.B. van der Vossen, R.J. Leer y J.H.J. Huis in't Veld (1994). Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 140-148.

- Thiercelin, E. y L. Jouhaud (1903). Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. *Comptes Rendus des Sèances de la Société de Biologie Paris*, 55: 686-688.
- Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680
- Thorisdottir, A.S., L.L. Carias, S.H. Marshall, M. Green, M.J. Zervos, C. Giorgio, L.A. Mermel, J.M. Boyce, A.A. Medeiros, H. Fraimow y L.B. Rice (1994). IS6770, an enterococcal insertion-like sequence useful for determining clonal relationship of clinical enterococcal isolates. *J. Infect. Dis.*, 170: 1539-1548.
- Tichaczek, P.S., J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, R.F. Vogel y W.P. Hammes (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH 673. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15: 460-468.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel y W. P. Hammes (1993). Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. *Arch. Microbiol.*, 160: 279-283.
- Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto y Y. Ike (1996). Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY117. *J. Bacteriol.*, 178: 3585-3593.
- Torri Tarelli, G., D. Carminati y G. Giraffa (1994). Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food Microbiol.*, 11: 243-252.
- Uchida, K., H. Mori y S. Mizushima (1995). Stepwise movement of preproteins in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 270: 30862-30868.
- Uguen, P., J. Hamelin, J.-P. Le Pennec y C. Blanco (1999). Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 291-293.
- Upreti, G.C. (1994). Lactocin 27, a bacteriocin produced by homofermentative *Lactobacillus helveticus* strain LP27. En "*Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*", pp. 331.335. De Vuyst, L. y E.J. Vandamme, (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres.

- Valent, Q.A., D.A. Kendall, S. High, R. Kusters, B. Oudega y J. Luirink (1995). Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interactions of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J.*, 14: 5494-5505.
- van Belkum, M.J., B.J. Hayema, R.E. Jeeninga, J. Kok y G. Venema (1991a). Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 492-498.
- van Belkum, M.J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I.F. Nes, W.N. Konings y T. Abee (1991b). The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.*, 173: 7934-7941.
- van Belkum, M.J. y M.E. Stiles (1995). Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3573-3579.
- van Belkum, M.J., R.W. Worobo y M.E. Stiles (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, 23: 1293-1301.
- van de Ven, F.J.M., H.W. van den Hooven, R.N.H. Konings y C.W. Hilbers (1991). NMR and circular dichroism studies of the lantibiotic nisin in non aqueous environments. *Eur. J. Biochem.*, 202: 1181-1188.
- Vandenbergh, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 221-238.
- van den Hooven, H.W., C.C.M. Doeland, M. van de Kamp, R.H.H. Konings, C.W. Hilbers y F.J.M. van de Ven (1996). Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur. J. Biochem.*, 235: 382-393.
- van der Does, C. (2000). Studies on the bacterial protein-conducting pore: the SecYEG complex. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen. Holanda.
- van der Does, C., T. Den Blaauwen, J.G. de Wit, E.H. Manting, N. Groot, P. Fekkes y A.J.M. Driessen (1996). SecA is an intrinsic subunit of the *Escherichia coli* preprotein translocase and exposes its carboxy-terminus to the periplasm. *Mol. Microbiol.*, 22: 619-629.



- van der Does, C., E. Manting, A. Kauffman, M. Lutz y A.J.M. Driessen (1998). Interaction between SecA and SecYEG in micellar solution and formation of the membrane inserted state. *Biochemistry*, 37: 12261-12268.
- van der Does, C., J. Swaving, W. van Klompenburg A.J.M. Driessen (2000). Non-bilayer lipids stimulate the activity of the reconstituted bacterial protein translocase. *J. Biol. Chem.*, 275: 2472-2478.
- van der Meer, J.R., J. Polman, M.M. Beerthuyzen, R.J. Siezen, O.P. Kuipers y W.M. de Vos (1993). Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 175: 2578-2588.
- van der Wolk, J.P.W., M. Klose, E. Breukink, R.A. Demel, B. de Kruijff, R. Freudl y A.J.M. Driessen (1993). Characterization of a *Bacillus subtilis* SecA mutant protein deficient in translocation ATPase and release from the membrane. *Mol. Microbiol.*, 8: 31-42.
- van der Wolk, J.P.W., J.G. de Wit y A.J.M. Driessen (1997). The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J.*, 16: 7297-7304.
- van Dijl, J.M. (1990). Protein export in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Holanda.
- van Dijl, J.M., A. de Jong, J. Vehmaanperä, G. Venema y S. Bron (1992). Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J.*, 11: 2819-2828.
- van Kraaij, C., E. Breukink, M.A. Noordermeer, R. Demel, R.J. Siezen, O.P. Kuipers y B. de Kruijff (1998). Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry*, 37: 16033-16040.
- van Laack, R.L.J.M., U. Schillinger y W.H. Holzapfel (1992). Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A. *Int. J. Food Microbiol.*, 16: 183-195.
- van Wely, K.H., J. Swaving y A.J.M. Driessen (1998). Translocation of the precursor of  $\alpha$ -amylase into *Bacillus subtilis* membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.*, 255: 690-697.
- van Veen, H.-W., M. Putman, A. Margolles, K. Sakamoto y W.N. Konings (1999). Structure-function analysis of multidrug transporters in *Lactococcus lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1461: 201-206.

van Veen, H.-W., A. Margolles, M. Muller, C.-F. Higgins y W.N. Konings (2000). The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.*, 19: 2503-2514.

Venema, K. (1995). Bacteriocins from lactic acid bacteria: lactococcins from *Lactococcus lactis* and pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Holanda.

Venema, K., T. Abee, A.J. Haandrikman, K.J. Leenhouts, J. Kok, W.N. Konings y G. Venema (1993). Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1041-1048.

Venema, K., R.E. Haverkort, T. Abee, J. Haandrikman, K.J. Leenhouts, L.D. Leij, G. Venema y J. Kok (1994). Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.*, 14: 521-532.

Venema, K., J. Kok, J.D. Marugg, M.Y. Toonen, A.M. Ledeboer, G. Venema y M.L. Chikindas (1995). Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC1.0: PedB es the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.*, 17: 515-522.

Venema, K., M.H.R. Dost, G. Venema y J. Kok (1996). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 142: 2825-2830 .

Venema, K., M.L. Chikindas, J.M.L. Seegers, A.J. Haandrikman, K.K. Leenhouts, G. Venema y J. Kok (1997). Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 305-309.

Vignolo, G.M., F. Suriani, A.P. de Ruiz Holgado y G. Oliver (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 344-349.

Vlaemynck, G., L. Herman y K. Coudijzer (1994). Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 211-225.

von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequences cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, 133: 17-21.

von Heijne, G. (1984). How signal sequences maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol.*, 177: 243-251.

- von Heijne, G. (1986). Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol. Biol.*, 192: 287-290.
- von Heijne, G. (1988). Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 947: 307-333.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J. Membr. Biol.*, 115: 195-201.
- Wachsman, M.B., M.E. Farías, E. Takeda, F. Sesma, A.P. de Ruíz Holgado, R.A. De Torres y C.E. Coto (2000). Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 12: 293-299.
- Wagner, W., Vogel, M. y Goebel, W. (1983). Transport of haemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *J. Bacteriol.*, 154: 200-210.
- Wandersman, C. (1992). Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.*, 8: 317-322.
- Wang, Y., M.E. Henz, N.L. Fregeau Gallagher, S. Chai, A.C. Gibbs, L.Z. Yan, M.E. Stiles, D.S. Wishart y J.C. Vederas (1999). Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*, 38: 15438-15447.
- Watson, M.E.E. (1984). Compilation of published signal sequences. *Nucl. Acids Res.*, 12: 5145-5164.
- Wickner, W., A.J.M. Driessen y F.-U. Hartl (1991). The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 101-124.
- Williams, A.M., J.A.E. Farrow y M.D. Collins (1989). Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA of *Streptococcus cecorum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 185-189.
- Williams, A.M., U.M. Rodrigues y M.D. Collins (1991). Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Res. Microbiol.*, 142: 67-74.
- Winkowski, K., A.D. Crandall y T.J. Montville (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2552-2557.

Winkowski, K., M.E.C. Bruno y T.J. Montville (1994). Correlation of bioenergetic parameters with cell death in *Listeria monocytogenes* cells exposed to nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 4186-4188.

Winkowski, K., R. Ludescher y T.J. Montville (1996). Physicochemical characterization of the nisin-membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 323-327.

Wolfe, P.B., C. Zwizinski y W. Wickner (1983). Purification and characterization of leader peptidase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, 97: 40-46.

Wood, B.J.B. (1985). En “*Microbiology of Fermented Foods*”. Elsevier, Londres.

Worobo, R.W., T. Henkel, M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1994). Characteristics and genetic determinants of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, 140: 517-526.

Worobo, R.W., M.J. van Belkum, M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas y M.E. Stiles (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.*, 177: 3143-3149.

Wu, M., E. Maier, R. Benz y E.E.W. Hancock (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38: 7235-7242.

Yang, R., M.C. Johnson y B. Ray (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3355-3359.

Yang, R. y B. Ray (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 11: 281-291.

Zajdel, J., P. Ceglowski y W.T. Dobrzanski (1985). Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 969-974.

## *APÉNDICES*



## APÉNDICES

### 1. ABREVIATURAS

**A:** Adenina  
**ABC:** del inglés *ATP Binding Cassette*  
**AIB:** Ácido aminoisobutírico  
**ATP:** del inglés *Adenosine Triphosphate*  
**APT:** del inglés *All Purpose Tween* (medio de cultivo)  
**B.:** *Bacillus*  
**BCECF:** 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5(y 6)-carboxifluoresceína  
**BHI:** del inglés *Brain Heart Infusion* (medio de cultivo)  
**BSA:** del inglés *Bovine Serum Albumin*  
**C:** Citosina  
**C.:** *Clostridium*  
**Cb.:** *Carnobacterium*  
**CF:** 5(6)-carboxifluoresceína  
**CIP:** del inglés *Calf Intestine Phosphatase*  
**CL:** Cardiolipina  
**Da:** Dalton  
**dATP:** del inglés 2'-*Deoxyadenosine-5'-Triphosphate*  
**dCTP:** del inglés 2'-*Deoxycytidine-5'-Triphosphate*  
**dGTP:** del inglés 2'-*Deoxiguanosine-5'-Triphosphate*  
**Dha:** Deshidroalanina  
**Dhb:** Deshidrobutirina  
**dTTP:** del inglés 2'-*Deoxithymidine-5'-Triphosphate*  
**DiSC<sub>3</sub>(5):** Ioduro de 3,3'-dipropiltiodicarbocianina  
**DNA:** del inglés *Deoxyribonucleic acid*  
**ΔpH:** Gradiente de pH  
**ΔΨ:** Potencial de membrana  
**DO<sub>620</sub>:** Absorbancia a 620 nm  
**DOPC:** Dioleilfosfatidilcolina  
**DOPG:** Dioleilfosfatidilglicerol  
**DTT:** Ditiotreitól  
**E.:** *Enterococcus*  
**E. coli:** *Escherichia coli*  
**EDTA:** Etilén diamino tetracetato disódico  
**FPLC:** del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*  
**G:** Guanina  
**GRAS:** del inglés *Generally Recognized as Safe*  
**GSP:** del inglés *General Secretory Pathway*  
**HEPES:** Tampón 2-(N-Hidroxietil) piperazina-etanosulfonato  
**HPK:** del inglés *Histidine Protein Kinase*  
**HPLC:** del inglés *High Performance Liquid Chromatography*

**IF:** del inglés *Induction Factor*  
**ILR:** Intensidad luminosa relativa  
**IMVs:** del inglés *Inner Membrane Vesicles*  
**IPTG:** Iso-propil-tio- $\beta$ -D galactósido  
**IOVs:** del inglés *Inside-Out Vesicles*  
**IS:** del inglés *Insertion Sequence*  
 $k_b$ : Tasa de producción de bacteriocina  
 $k'$ : Tasa de inactivación de bacteriocina  
**kb:** kilobase  
**kDa:** kilodalton  
**L.:** *Lactococcus*  
**L. cremoris:** *L. lactis* subesp. *cremoris*  
**L. lactis:** *L. lactis* subesp. *lactis*  
**Lan:** Lantionina  
**Lb.:** *Lactobacillus*  
**Lc.:** *Leuconostoc*  
**Lep:** del inglés *Leader Peptidase*  
**LPS:** Lipopolisacáridos  
**Ls.:** *Listeria*  
**MCS:** del inglés *Multiple Cloning Site*  
**MDR:** del inglés *Multidrug Resistance*  
**MeLan:** Metil-lantionina  
**MES:** Tampón 2-(N-morfolino)-etanosulfonato  
**mRNA:** RNA mensajero  
**MRS:** de Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo)  
 $\mu_{\text{máx}}$ : Velocidad específica de crecimiento máxima  
**NADH:** forma reducida de Nicotinamida-Adenín-Dinucleótido  
**ND:** No determinado/a  
**NMR:** del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*  
**OG:** Octil- $\beta$ -D-glucopiranosido  
**ORF/orf:** del inglés *Open Reading Frame*  
**P.:** *Pediococcus*  
**Pr.:** *Propionibacterium*  
**PBFI:** del inglés *Potassium-Binding Benzofuran Isophthalate*  
**PC:** Fosfatidilcolina  
**PCR:** del inglés *Polymerase Chain Reaction*  
**PCS:** Peso celular seco  
**PG:** Fosfatidilglicerol  
**PI:** Punto isoeléctrico  
**PMF:** del inglés *Proton Motive Force*  
**p/p:** Peso/peso  
**prl:** del inglés *Protein Localization*  
**PSA:** Persulfato amónico  
**p/v:** Peso/volumen



**RCM:** del inglés *Reinforced Clostridium Medium*

**RNA:** del inglés *Ribonucleic acid*

**rRNA:** RNA ribosómico

**RR:** del inglés *Response Regulator*

**S.:** *Streptococcus*

**S.D.:** Región Shine-Dalgarno o de unión al ribosoma

**SDS-PAGE:** del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**SP:** del inglés *Signal Peptide*

**SRD:** Secuencia repetida directa

**SRI:** Secuencia repetida inversa

**SRP:** del inglés *Signal Recognition Particle*

**St.:** *Staphylococcus*

**T:** Timidina

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TFA:** Ácido trifluoroacético

**TGI:** Tracto gastrointestinal

**Tm:** del inglés *Melting Temperature*

**TMS:** del inglés *Transmembrane Segment*

**TX-100:** Tritón X-100

**ua:** Unidad arbitraria

**UA:** Unidad de absorbancia

**ufc:** Unidades formadoras de colonias

**UB:** Unidad de bacteriocina

**v/v:** Volumen/volumen

**ZIND:** Zona de inhibición no detectada

## 2. ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS Y CÓDIGO GENÉTICO

### 2.1. Abreviaturas de los aminoácidos

Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

### 2.2. Código genético

Segunda Posición

Primera posición (extremo 5')	Segunda Posición				Tercera posición (extremo 3')
	U	C	A	G	
	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	
	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	
	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } ACA } Thr ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	

### 3. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

#### 3.1. Lista de tablas

CAPÍTULO II	Página
<b>Tabla II.1.</b> Especies incluidas en el género <i>Enterococcus</i> .....	8
<b>Tabla II.2.</b> Péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal eucarióticos y procarióticos .....	14
<b>Tabla II.3.</b> Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas caracterizadas bioquímica y genéticamente ..	15
<b>Tabla II.4.</b> Espectro de acción de enterocinas producidas por diversas cepas de <i>E. faecium</i> .....	21
<b>Tabla II.5.</b> Localización de los determinantes genéticos de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas .....	26
<b>Tabla II.6.</b> Condiciones óptimas para la producción de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas .....	34
<b>Tabla II.7.</b> Mecanismo de acción de algunas bacteriocinas de la clase II .....	64
 CAPÍTULO III	
<b>Tabla III.1.</b> Microorganismos indicadores utilizados en este trabajo .....	72
<b>Tabla III.2.</b> Oligonucleótidos sintéticos empleados en los experimentos de PCR y secuenciación nucleotídica .....	82
<b>Tabla III.3.</b> Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	89
<b>Tabla III.4.</b> Actividad antimicrobiana cruzada de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16, <i>E. faecium</i> P21, <i>E. faecium</i> P13 y <i>E. faecium</i> T136 e inmunidad a sus sustancias antimicrobianas exocelulares .....	90
<b>Tabla III.5.</b> Actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 tras diversos tratamientos físico-químicos .....	91
<b>Tabla III.6.</b> Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las cepas <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 cultivadas en los caldos APT, MRS y BHI .....	93
<b>Tabla III.7.</b> Purificación de las bacteriocinas producidas por <i>E. faecium</i> AA13 .....	96
<b>Tabla III.8.</b> Purificación de las bacteriocinas producidas por <i>E. faecium</i> G16 .....	97
<b>Tabla III.9.</b> Purificación de las bacteriocinas producidas por <i>E. faecium</i> P21 .....	98
<b>Tabla III.10.</b> Parámetros físico-químicos de los factores de inducción de la enterocina A, carnobacteriocina B2 y sakacina A .....	132
 CAPÍTULO IV	
<b>Tabla IV.1.</b> Influencia del NaCl y del etanol en el crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 y en la producción de enterocina P .....	161
<b>Tabla IV.2.</b> Cinética del crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en un fermentador a diferentes valores de pH .....	167
<b>Tabla IV.3.</b> Parámetros $k_b$ y $k'$ de los cultivos de <i>E. faecium</i> P13 desarrollados en un fermentador con regulación del pH .....	171
<b>Tabla IV.4.</b> Influencia del pH en la adsorción de la enterocina P a las células de <i>E. faecium</i> P13 .....	173
<b>Tabla IV.5.</b> Influencia del pH en la actividad antimicrobiana de la enterocina P .....	174
<b>Tabla IV.6.</b> Actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes de <i>E. faecium</i> P13 a diversos valores de pH ...	175
 CAPÍTULO VI	
<b>Tabla VI.1.</b> Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados en la amplificación de <i>entP</i> .....	237
<b>Tabla VI.2.</b> Secuencia del SP de las bacteriocinas <i>sec</i> -dependientes de las bacterias lácticas .....	254

## 3.2. Lista de figuras

### CAPÍTULO II

### Página

<b>Fig. 2.1.</b> Representación esquemática de la organización de los determinantes genéticos de las enterocinas producidas por <i>E. faecium</i> .....	25
<b>Fig. 2.2.</b> Representación esquemática de un sistema de transducción de señales de tres componentes .....	30
<b>Fig. 2.3.</b> Representación esquemática de un sistema de secreción ABC clásico en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas .....	37
<b>Fig. 2.4.</b> Representación esquemática del sistema de maduración y secreción de las lactococcinas .....	40
<b>Fig. 2.5.</b> Representación esquemática de los componentes de la translocasa bacteriana .....	42
<b>Fig. 2.6.</b> Modelo para la translocación en etapas de los precursores proteicos provistos de un SP .....	46
<b>Fig. 2.7.</b> Estructura secundaria de algunos péptidos antimicrobianos eucarióticos .....	49
<b>Fig. 2.8.</b> Generación de la PMF en bacterias aerobias y anaerobias. Mecanismo de acción de los ionóforos valinomicina y nigericina. Procesos en los que interviene la PMF .....	53
<b>Fig. 2.9.</b> Modelos propuestos para explicar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos .....	56
<b>Fig. 2.10.</b> Modelo de cuña del mecanismo de acción de la nisina .....	60

### CAPÍTULO III

<b>Fig. 3.1.</b> Crecimiento, actividad antimicrobiana y pH de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	95
<b>Fig. 3.2.</b> Purificación de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> AA13 por cromatografía en fase inversa .....	100
<b>Fig. 3.3.</b> Purificación de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> G16 por cromatografía en fase inversa .....	101
<b>Fig. 3.4.</b> Purificación de las bacteriocinas de <i>E. faecium</i> P21 por cromatografía en fase inversa .....	102
<b>Fig. 3.5.</b> Electroforesis en geles de agarosa del ADN cromosómico y plasmídico de <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P21 .....	104
<b>Fig. 3.6.</b> Diseño de los cebadores LP6 y LP7 a partir de la secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina P ( <i>entP</i> ) .....	105
<b>Fig. 3.7.</b> Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a: (A) <i>entP</i> en <i>E. faecium</i> AA13, <i>E. faecium</i> G16 y <i>E. faecium</i> P13; (B) <i>entA</i> en <i>E. faecium</i> P21 y <i>E. faecium</i> T136, y <i>entB</i> en <i>E. faecium</i> P21 y <i>E. faecium</i> T136 .....	107
<b>Fig. 3.8.</b> Secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina P ( <i>entP</i> ), de su hipotético gen de inmunidad ( <i>entiP</i> ) y de las regiones adyacentes .....	109
<b>Fig. 3.9.</b> Secuencia nucleotídica del gen estructural de la enterocina A ( <i>entA</i> ), del gen de su hipotética proteína de inmunidad ( <i>orf2</i> o <i>entiA</i> ) y de la región adyacente a éste .....	111
<b>Fig. 3.10.</b> Diseño del cebador degenerado CH1 a partir de la secuencia aminoacídica de las fracciones A, C, D, E y F .....	114
<b>Fig. 3.11.</b> Comparación de la secuencia aminoacídica de los factores de inducción de la enterocina A (EntF), carnobacteriocina B2 (CbnS) y sakacina A (ORF4) .....	130
<b>Fig. 3.12.</b> Perfil de hidrofobicidad de los factores de inducción EntF (A), CbnS (B) y ORF4 (C) .....	132
<b>Fig. 3.13.</b> Análisis de la secuencia nucleotídica de las regiones intergénicas <i>entiA-entF</i> de <i>E. faecium</i> P21 y <i>E. faecium</i> CTC492 .....	134
<b>Fig. 3.14.</b> Representación esquemática de los genes del operón de la enterocina A identificados en <i>E. faecium</i> P21, <i>E. faecium</i> DPC1146 y <i>E. faecium</i> CTC492 .....	135

### CAPÍTULO IV

<b>Fig. 4.1.</b> Cinéticas de crecimiento y producción de enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en caldo MRS a un pH inicial de 4,7, 5,3, 5,7 y 6,0 .....	155
---	-----

<b>Fig.4.2.</b> Cinéticas de crecimiento y producción de enterocina P de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en caldo MRS a un pH inicial de 6,2, 6,5, 7,0 y 8,0 .....	156
<b>Fig.4.3.</b> Comparación de las cinéticas de crecimiento, producción de actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en caldo MRS a pH inicial 4,7; 5,3; 5,7; 6,0; 6,5; 7,0 y 8,5, y del cultivo control .....	157
<b>Fig.4.4.</b> Cinética de crecimiento, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C en ausencia de NaCl, o en presencia de un 0,5%, 0,75%, 1%, 3% y 5% .....	159
<b>Fig.4.5.</b> Cinética de crecimiento, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado en caldo MRS a 32°C en ausencia de etanol, o en presencia de un 0,5%, 0,75%, 1%, 2%, 4% y 6% ...	160
<b>Fig.4.6.</b> Cinéticas de crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 4,7; 5,0 y 5,3 .....	163
<b>Fig.4.7.</b> Cinéticas de crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 5,7, 6,0 y 6,2 .....	164
<b>Fig.4.8.</b> Cinéticas de crecimiento, producción de enterocina P y consumo de glucosa, o pH de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 7,0 y 8,5, y sin controlarlo .....	165
<b>Fig.4.9.</b> Comparación de las cinéticas de crecimiento, producción de actividad antimicrobiana, actividad antimicrobiana específica y consumo de glucosa de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en un fermentador a pH constante 4,7; 5,0; 5,3; 5,7; 6,0; 6,2, 7,0, y 8,5 .....	166
<b>Fig.4.10.</b> Expresión del crecimiento de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado a 32°C en un fermentador manteniendo el pH constante a 4,7; 5,0; 5,3; 5,7; 6,0; 6,2; 7,0; 8,5 y sin el regulación del pH mediante el modelo de Baranyi y Roberts.....	169
<b>Fig.4.11.</b> Dependencia del $\ln \mu_{\max}$ con respecto al pH .....	170
<b>Fig.4.12.</b> Dependencia del $\ln k_b$ con respecto al pH .....	172
<b>Fig.4.13.</b> Dependencia del $k'$ con respecto al pH .....	172
<b>Fig.4.14.</b> Cinética de crecimiento, actividad antimicrobiana, actividad antimicrobiana específica y pH de <i>E. faecium</i> P13 desarrollado en caldo BHI a 32°C en ausencia de sobrenadantes activos de <i>E. faecium</i> P13 o en presencia de un 0,1%, 1% y 5%, y en caldo BHI con MRS al 5% .....	177

## CAPÍTULO V

<b>Fig.5.1.</b> Recuentos de un cultivo de <i>E. faecium</i> T136 tratado con $2,5 \times 10^3$ UB/ml de enterocina P y sin tratar. Densidad óptica de un cultivo de <i>E. faecium</i> T136 previamente tratado con enterocina P ( $5 \times 10^3$ UB/ml) e inoculado en ausencia o en presencia de $2,5 \times 10^3$ UB/ml de enterocina P. Densidad óptica de un cultivo de <i>E. faecium</i> T136 tratado con $1 \times 10^4$ UB/ml de enterocina P y sin tratar . (D). Cultivos de 24 h de <i>E. faecium</i> T136 tratado con $5 \times 10^3$ UB/ml de enterocina P y sin tratar .....	212
<b>Fig.5.2.</b> Concentración de ATP intracelular de células de <i>E. faecium</i> T136 tratadas con 5, 20, 50 y 100 UB/ml de enterocina P, sin tratar, o tratadas con 50 UB/ml de enterocina P durante 20 min previamente al proceso de energización .....	213
<b>Fig.5.3.</b> Efecto de la enterocina P (60 UB/ml) en el transporte de $Rb^{86}$ en células de <i>E. faecium</i> T136, <i>E. faecium</i> P13 y <i>E. faecium</i> T136r. Efecto de la enterocina P (60 UB/ml) en el transporte de $C^{14}$ -glutamato y $Pi^{33}$ -fosfato en células de <i>E. faecium</i> T136 .....	215
<b>Fig.5.4.</b> Efecto de la enterocina P en el $\Delta pH$ de células de <i>E. faecium</i> T136 cargadas de BCECF .....	216
<b>Fig.5.5.</b> Efecto de la enterocina P en el $\Delta \Psi$ de <i>E. faecium</i> , <i>E. faecium</i> T136r y <i>E. faecium</i> T136 .....	218
<b>Fig.5.6.</b> Efecto de la enterocina P en el movimiento transmembrana de $K^+$ en células de <i>E. faecium</i> T136 .....	219
<b>Fig.5.7.</b> Efecto de la enterocina P en la liberación de CF de liposomas derivados de los lípidos totales de <i>E. faecium</i> T136 .....	220
<b>Fig.5.8.</b> Efecto de la enterocina P en liposomas sintéticos de DOPC-DOPG (1:1) cargados de $Rb^{86}$ , PBFI y $K^+$ .....	221

<b>Fig.5.9.</b> Perfil de hidrofobicidad de la enterocina P y representación en rueda helicoidal de los residuos 27 a 44 de la enterocina P .....	224
---	-----

## CAPÍTULO VI

<b>Fig.6.1.</b> Estrategia de clonación de <i>entP</i> en el vector pET401 y obtención del vector recombinante pET1899 .....	239
<b>Fig.6.2.</b> Síntesis de [S <sup>35</sup> ]-Cys-preproenterocina P mediante transcripción-traducción <i>in vitro</i> .....	246
<b>Fig.6.3.</b> Ensayo de translocación <i>in vitro</i> de la preproenterocina P empleando IMVs y SecA de <i>E. coli</i> .....	247
<b>Fig.6.4.</b> Ensayo de translocación <i>in vitro</i> de la preproenterocina P empleando IMVs y SecA de <i>E. coli</i> SecYEG <sup>+</sup> ..	248
<b>Fig.6.5.</b> Ensayo de translocación acoplada a la transcripción/traducción <i>in vitro</i> de la preproenterocina P empleando SecA e IMVs de <i>E. coli</i> o SecA de <i>B. subtilis</i> e IMVs de <i>E.coli</i> que expresan SecYEG de <i>B. subtilis</i> ..	249
<b>Fig.6.6.</b> Ensayo del procesamiento <i>in vitro</i> de la preproenterocina P por Lep de <i>E. coli</i> .....	250
<b>Fig.6.7.</b> Ensayo del procesamiento <i>in vitro</i> de la preproenterocina P por la SipS de <i>B. subtilis</i> .....	251
<b>Fig.6.8.</b> Modelo para la iniciación de la translocación proteica .....	258

